

SUSANNE FACCHIN

**Isolamento de microrganismos e seleção de enzimas
microbianas com aplicações biotecnológicas no
tratamento de esgotos**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Genética.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Belo Horizonte
Janeiro/2013

Dedico este trabalho aos dois homens mais maravilhosos que poderiam, um dia, ter seu caminho entrelaçado ao meu:

Pai, espelho meu, tudo que sou ou sonho ser, agradeço às orientações e ensinamentos que recebi de você por toda vida.

Getúlio, companheiro de cada dia, meu alicerce e meu porto seguro, ao seu lado encontro coragem e disposição para buscar tudo aquilo que já sonhei.

AMO

*O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou,
mas sim pelas dificuldades que superou no caminho.*
Abraham Lincoln

*Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.
As facilidades nos impedem de caminhar.
Mesmo as críticas nos auxiliam muito*
Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Evanguedes Kalapothakis, pela oportunidade de fazer parte de sua equipe, pela paciência e persistência, e por não ter desistido de minha formação, mesmo quando minhas forças foram escassas, meu sincero agradecimento. Muito da profissional que sou hoje eu devo a esses seis anos de ensinamentos.

À Phoneutria Biotecnologia e Serviços, que apoiou e financiou este projeto. Permitiu que esse trabalho fosse quase completamente desenvolvido em suas dependências, e sempre acreditou na minha capacidade.

Aos professores membros da banca de qualificação pela discussão e mudanças no rumo deste trabalho.

Aos professores membros da banca examinadora pela atenção na avaliação e aprimoramento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética pela oportunidade e pelo apoio.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares (LBMM) pelo apoio, amizade, acolhimento e trabalho em equipe. Aprendi muito com vocês. Carinho especial: Anderson, Isabella, Carolina, Ana Paula, Antônia, Flávia, Érika, Bárbara Freitas, Bárbara Bruna e Tatiana.

Aos colegas espalhados pelo ICB, Fábio, Arthur e Samyra, por sempre terem estendido a mão quando precisei.

Ao Professor Carlos Salas por me receber gentilmente, permitindo que eu utilizasse os equipamentos de seu laboratório.

Aos colegas da PHT por todos os anos que passamos juntos, toda a ajuda e suporte fornecido. Em especial à Júnia e Priscila. Saudades: Sara, Kelly e Denise.

Aos queridos colegas da Simile Instituto de Imunologia Aplicada, por todo apoio e pela confiança depositada em mim. Em especial às Dra. Carla Ronda e Dra. Kátia Silveira, o suporte de vocês foi fundamental. Saudades: Thaís.

À minha família, por fazer de minha formação sua meta e sempre me apoiarem, qualquer que fosse o caminho escolhido. As orientações e questionamentos de vocês me trouxeram até aqui. Pai, Mãe e Cacá, amor incondicional.

Ao meu querido Getúlio por acreditar e incentivar meus projetos pessoais como se fossem dele próprio. Viver ao seu lado é maravilhoso.

Aos amigos queridos da @biologia2001, que há mais de uma década me acompanham e dividem comigo alegrias e frustrações da profissão e fora dela, obrigada pelo carinho.

Às queridas amigas que de longe se mantêm tão perto e tão presentes: Carolina Brasil e Fernanda Badotti, amo vocês duas!

À Maria e ao nosso grupo pelo apoio e excelente par de óculos, que me ajudou a enxergar tudo com mais Graça e mais clareza.

Aos pequenos Freud e Frida pelo amor e companhia constantes.

A participação de cada um de vocês foi
essencial para a concretização deste projeto.
Obrigada!

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- ✓ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), com destaque para os projetos: 580311/2008-2; 560912/2010-2; 551113/2011-1; e 300721/2012-9.
- ✓ Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda.

Por solicitação da empresa financiadora, partes deste estudo foram suprimidas desta versão. Para maiores informações ou para ter acesso ao conteúdo integral, entre em contato com a autora.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE TABELAS	IV
LISTA DE ABREVIACÕES	V
RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Qualidade dos recursos hídricos no Brasil e no mundo.....	1
1.2. O esgoto.....	4
1.3. Composição química do esgoto.....	6
1.3.1. Óleos, gorduras e enzimas lipolíticas	7
1.3.2. Proteínas e proteases.....	11
1.3.3. Carboidratos (amido e celulose), amilases e celulasas.....	13
1.4. O tratamento de esgoto.....	16
1.4.1. Biossurfactantes no tratamento de efluentes	19
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	25
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo Geral	26
3.2. Objetivos específicos.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. Amostragem	27
4.1.1 Seleção de microrganismos produtores de lipase utilizando tributirina como substrato.....	28
4.2. Perfil enzimático.....	28
4.3. Caracterização da lipase extracelular	32
4.3.1. Produção de extrato enzimático extracelular	32
4.3.2. Determinação de ponto ótimo de atividade: pH e temperatura.....	34
4.3.3. Quantificação da atividade lipásica em ésteres de p-nitrofenol	34
4.3.4. Teste de resistência térmica e de atividade enzimática em presença de agentes químicos	36
4.4. Identificação dos microrganismos	36
4.4.1. Extração de DNA.....	36
4.4.2. Amplificação e sequenciamento do gene de RNA ribossomal.....	37
4.5. Indução da produção de lipase e efeito do sinergismo entre diferentes linhagens lipolíticas	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÕES	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
8. ANEXOS	73
8.1. Artigos publicados:.....	73
8.2. Artigos aceitos para publicação:.....	73
8.3. Artigos em colaboração:.....	74

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Fórmula estrutural de uma molécula de glicerol e de um triglicerídeo saturado de 3 cadeias éster de 6 carbonos 8
- Figura 2: Estrutura de lipase de *Pseudomonas aeruginosa* baseada no modelo construído para lipase de *Burkholderia cepacia* usando o raio-X coordenado. Fitas- β são representadas como flechas (vermelho) e α -hélices como rolo (azul e amarelo); a hélice amarela pode formar uma “tampa” sobre o sítio ativo. Os resíduos do sítio ativo Ser82, Asp229 e His251 estão evidenciados, e a posição do íon Ca^{2+} é indicada pelo círculo verde (Jaeger & Reetz, 1998)..... 10
- Figura 3: Hidrólise seqüencial dos 3 grupamentos acila de um triglicerídeo, catalisada por lipases (Mendes & Castro, 2005). 10
- Figura 4: Arranjo cristalino do polímero de celulose e ação sinérgica dos 3 grupos de celulosas: endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases para liberação de moléculas de glicose. (modificado de Karmakar & Ray, 2011)..... 16
- Figura 5: Estrutura da surfactina (Mulligan, 2005) 21
- Figura 6: Meio de cultura 1, Agarose tributirina. Setas indicam o halo translúcido ao redor da cultura. Note as diferentes proporções da intensidade e do tamanho do halo/tamanho da cultura, na figura 6A. Na figura 6B é possível visualizar que mesmo não tendo ocorrido crescimento visível, era possível observar a atividade lipolítica. 30
- Figura 7: Meio de cultura 2, Agarose Caseína. A- antes da revelação; B- após revelação com ácido clorídrico 1 N; C- detalhe do halo translúcido formado ao redor da cultura e a visualização da caseína precipitada. Setas indicam o halo translúcido ao redor da cultura evidenciando presença de atividade proteásica. 30
- Figura 8: Meio de cultura 3, Agarose Amido de milho, A- antes da revelação; B após revelação com solução de iodo a 2%. Setas indicam o halo translúcido ao redor da cultura evidenciando presença de atividade amilásica. 30
- Figura 9: Meio de cultura 4, Agarose carboximetilcelulose após revelação com vermelho congo e em seguida, solução descolorante. Setas indicam o halo translúcido ao redor da cultura evidenciando atividade celulásica..... 31

Figura 10: Meio de cultura 5, meio de gelatina, 1- controle negativo; 2- culturas positivas que liquefizeram o meio por proteólise do colágeno presente na gelatina.	31
Figura 11: Meio de cultura LB com 2% de óleo de soja em estado bruto (1); com crescimento microbiano (2); e (3) com crescimento microbiano e emulsificação. Note o aspecto leitoso adquirido pelo meio de cultura.....	31
Figura 12: Etapas de produção de extrato de lipase extracelular. A) Esquema de montagem da placa para expressão de lipase; B) Aspecto do meio de cultura Agar Spirit Blue com 0,6% v/v de tributirina, sem membrana e sem inóculo; C) Aspecto do meio Agar Spirit Blue coberto por membrana de diálise, com crescimento microbiano e expressão enzimática; D) Lavagem da membrana de diálise com tampão; E) Aspecto do extrato enzimático bruto coletado da placa de expressão; F) Aspecto do extrato enzimático logo após centrifugação e previamente a filtração.....	33
Figura 13: Fórmula química dos ésteres de p-nitrofenol utilizados no experimento de quantificação enzimática. A) p-nitrofenol butirato; B) p-nitrofenol decanoato; C) p-nitrofenol palmitato.....	35
Figura 14: Representação esquemática do gene do RNA ribossômico eucariótico, evidenciando o fragmento D1/D2 amplificado por PCR para sequenciamento e identificação molecular.....	37
Figura 15: Estado metabólico de 5 linhagens diferentes quando pré-inóculos induzidos e não induzidos foram desafiados à hidrólise de um triglicerídeo simples de cadeia curta, uma mistura complexa de triglicerídeos de cadeias longas (óleo de soja) e uma emulsão oleosa dessa mistura complexa de triglicerídeos.....	53

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Locais de coleta, identificação dos isolados, números de acesso às sequências depositadas no GenBank e perfil enzimático dos isolados..... 42
- Tabela 2: Local de coleta, tempo de incubação sobre membrana de diálise para expressão lipásica, pH e temperatura ótimos de atividade lipásica e quantificação enzimática com p-NPB (C4), p-NPD (C10), and p-NPP (C16) – valores expressos em unidades de lipase..... 45
- Tabela 3: Porcentagem de atividade lipásica residual após diferentes tratamentos 47

LISTA DE ABREVIACÕES

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANA - Agência Nacional de Águas

BID - Banco Interamericano de Desenvolvimento

Conama - Conselho Nacional do Meio Ambiente

DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio

DO - Densidade Óptica

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde - órgão do Ministério da Saúde do governo brasileiro encarregado de promover saneamento básico à população

IQA – Índice de Qualidade da Água

LAS-C12 - Dodecil Benzeno Sulfonato de Sódio Linear

NBR – Norma Brasileira

ODM - Objetivos de Desenvolvimento do Milênio

ONG – Organização não Governamental

ONU - Organização das Nações Unidas

PNUD - Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento no Brasil

Pnuma - Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente

p-NP - p-nitrofenol

RDH - Relatório de Desenvolvimento Humano

RDP - *Ribosomal Database Project*

RESUMO

Os principais contaminantes orgânicos em esgotos municipais são as proteínas, polissacarídeos e lipídeos, os quais deveriam ser hidrolisados à suas menores unidades antes do efluente ser despejado nos recursos hídricos. Altas concentrações de óleos e gorduras nos efluentes afetam o processo de tratamento biológico de esgotos pela formação de uma camada na superfície da água a qual reduz as taxas de transferência de oxigênio em um processo aeróbico. Proteases, lipases, amilases e celulasas de origem microbiana podem desempenhar um papel primordial no tratamento biológico de efluentes. Este trabalho de doutorado teve o objetivo de isolar microrganismos produtores de lipases e outras enzimas hidrolíticas e avaliar seu perfil de degradação de lipídeos e outros compostos orgânicos, em escala laboratorial. Enfatizamos o estudo na atividade lipolítica, pois óleos e gorduras constituem um dos principais poluentes orgânicos e com conseqüências mais graves aos organismos aquáticos, e podem ainda, formar uma crosta espessa nas tubulações e equipamentos das estações de tratamento de esgoto, provocando entupimentos e avarias. Trinta e cinco isolados lipolíticos, provenientes de efluentes industriais e domésticos, foram identificados e avaliados quanto ao perfil de produção de enzimas hidrolíticas. Extratos lipolíticos produzidos por estes isolados foram caracterizados quanto à quantidade unidades enzimáticas, afinidade por diferentes comprimentos de cadeias éster e condições ótimas de pH e temperatura. A estabilidade apresentada pelos extratos lipolíticos em presença de agentes químicos e após tratamento térmico, além de atividade e tolerância em ampla faixa de pH e afinidade por ésteres de comprimentos variados de cadeias, são um indício de que algumas destas enzimas são candidatas promissoras para hidrólise de lipídios em águas residuais. Uma combinação de enzimas e bactérias fermentadoras pode facilitar a hidrólise completa de triglicerídeos, proteínas e lignocelulose que normalmente ocorrem em efluentes industriais.

Palavras chave: Lipase, esterase, esgoto, tratamento de esgoto, microrganismos lipolíticos, amilase, protease, celulase.

ABSTRACT

The main organic contaminants in municipal wastewater are proteins, polysaccharides, and lipids, which must be hydrolyzed to smaller units. A high concentration of oil and grease in wastewater affects biological wastewater treatment processes by forming a layer on the water surface, which decreased the oxygen transfer rate into the aerobic process. Microbial proteases, lipases, amylases, and celullases should play essential roles in the biological wastewater treatment process. The present study aimed to isolate lipase- and other hydrolytic enzyme-producing microorganisms and assess their degradation capabilities of fat and oil wastewater in the laboratory. We also evaluated microbial interactions as an approach to enhance lipolytic activity. We place emphasis on lipase activity because oil and grease are not only environmental pollutants, but also form an undesirable tough crust on pipes of sewage treatment plants. Thirty-five lipolytic microorganisms from sewage were identified and assessed for hydrolytic enzyme profiles. Lipases were characterized in detail by quantification, chain length affinity, and optimal conditions for activity. The good stability of isolated lipases in the presence of chemical agents, thermal stability, wide range of pH activity and tolerance, and affinity for different lengths of ester chains indicates that some of these enzymes may be good candidates for the hydrolysis of organic compounds present in wastewater. A combination of enzymes and fermenting bacteria may facilitate the complete hydrolysis of triglycerides, proteins, and lignocellulose that normally occur in the wastes of industrial processes.

Keywords: Lipase, esterase, wastewater, sewage treatment, lipolytic microorganisms, amylase, protease, cellulase

1. INTRODUÇÃO

1.1. Qualidade dos recursos hídricos no Brasil e no mundo

A água é um elemento crucial à vida. De toda água existente no planeta, 97,5% encontra-se nos oceanos. Dos 2,5% de água doce restante apenas um por cento é acessível ao uso. Os ecossistemas aquáticos, quando preservados, fornecem ao homem uma variedade de benefícios, como alimentos, medicamentos, recreação, transporte, etc. Porém, o contínuo crescimento populacional, a industrialização, as práticas agrícolas e a melhora global dos padrões de vida, aliado à falta de estratégias para reutilização dos recursos hídricos levou o mundo a se deparar no início do século XXI com uma crise da água, tanto em quantidade quanto em qualidade. Apesar de 89% da população mundial utilizar fontes de água tratada, é possível observar grandes contrastes entre diferentes regiões. Na África Subsaariana, apenas 61% das pessoas fazem uso de água provinda de fontes tratadas de abastecimento enquanto que na América Latina, Norte da África e grande parte da Ásia, esse número já sobe para 90% (Departamento de Informação Pública das Nações Unidas, 2012). A gestão dos resíduos (ou a falta dela) afeta diretamente o ecossistema aquático e sua diversidade, do qual dependem diversos setores alimentícios e industriais. É essencial que a gestão das águas residuais seja considerada como parte integrante dos processos produtivos e do cotidiano doméstico. Em todo o mundo, aproximadamente 900 milhões de pessoas ainda vivem sem acesso à água potável (UNDESA, 2009), e cerca de 2,6 bilhões de pessoas, quase a metade da população dos países em desenvolvimento, não têm acesso a saneamento básico (WHO/UNICEF, 2008).

Em 2010, no dia mundial da água, o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (Pnuma) fez uma análise dos recursos hídricos no mundo e a publicou no relatório *Sick Water* (Corcoran *et al.*, 2010). De acordo com o documento, mais pessoas morrem anualmente, no mundo, por doenças causadas pela contaminação e poluição de águas fluviais e marítimas do que por todas as formas de violência em conjunto, incluindo as guerras. Entre crianças menores de 5 anos de idade, o índice mundial anual de mortes está em 17%. O relatório aponta ainda que, na época de seu lançamento, mais da metade dos leitos hospitalares no mundo estavam ocupados por pessoas com doenças relacionadas à água contaminada, como diarreia, hepatite e cólera. Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), a rápida urbanização e o excessivo lançamento

de resíduos sólidos nos rios, mares e oceanos ameaça significativamente o abastecimento de água global. Esses resíduos seriam provenientes, principalmente, do esgoto de indústrias e do setor agrícola, e causariam a contaminação de cerca de dois bilhões de toneladas de água, todos os dias. Ainda de acordo com o Pnuma, seria impossível reverter completamente essa situação, mas a adoção de algumas medidas ajudaria a amenizar e evitar o agravamento do problema (Corcoran *et al.*, 2010). As medidas seriam: 1) proteger as áreas de terra úmida, que agem como filtros naturais do esgoto; 2) usar os dejetos dos animais como fertilizante, ao invés de despejá-los na água; 3) adotar sistemas de reciclagem de água; e 4) investir em projetos multimilionários para o tratamento de esgoto (Corcoran *et al.*, 2010).

Segundo matéria exibida no Jornal Nacional em 22 de março de 2012, a ONG Fundação SOS Mata Atlântica avaliou a qualidade da água de 49 rios, córregos, ribeirões, represas, lagos e açudes em pontos diferentes do território nacional e classificou 75,5% como "regular" e 24,5% como "ruim". As análises seguiram padrões do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA 357 - Conselho Nacional do Meio Ambiente 2005) e foram realizadas em 11 estados brasileiros entre janeiro de 2011 e março de 2012. Foi apontado que nenhum dos corpos de água avaliados tem a qualidade da água satisfatória e que ainda não se encontrou água de boa qualidade em rios brasileiros. Apesar disso, essa situação representa uma melhora, já que entre maio de 2009 e dezembro de 2010, essa mesma fundação havia avaliado 75 cursos de água e também não havia constatado nenhum caso "bom" ou "ótimo". No entanto, no primeiro levantamento três rios haviam sido considerados "péssimos" - categoria não encontrada na pesquisa mais recente, que analisou menor número de corpos de água (Rossi, 2012). Alguns dos rios que fizeram parte da primeira edição foram reavaliados no segundo levantamento. Dos 19 casos, 12 não mudaram de categoria, 5 melhoraram e dois pioraram. O destaque da melhora foi o Rio Passo dos Índios, em Chapecó, que passou de péssimo para regular. Porém, apesar da melhora verificada, a tendência é que ocorra um agravamento da situação geral da água no mundo, sobretudo pelo crescimento das cidades e pelo mau uso deste recurso. Os locais analisados na pesquisa divulgada em 2012 sofrem maior influência de esgoto e lixo e estão localizados em zonas de grande urbanização, no entanto, a qualidade da água dos rios na zona rural também seria crítica, uma vez que nessas áreas ocorre intenso uso de agrotóxicos e fertilizantes, além do desmatamento de matas ciliares e áreas de proteção permanente (Rossi, 2012).

Outro estudo mais abrangente, realizado pelo consórcio entre o Banco Interamericano de Desenvolvimento (BID) e a Agência Nacional de Águas (ANA), realizado entre 2001 e 2010, concluiu que dos 1.988 pontos monitorados no país em 2010, tanto em áreas urbanas como rurais, observou-se condição “ótima” em 6% dos pontos monitorados, “boa” em 75%, “regular” em 11%, “ruim” ou “péssima” em 7%. Porém, ao se analisar apenas os corpos d’água localizados em áreas urbanas, observa-se que, em 2010, 47% dos pontos monitorados apresentaram classificação da qualidade “péssima” ou “ruim”, devido à alta taxa de urbanização do país e dos baixos níveis de coleta e tratamento de esgotos domésticos. Vale ressaltar que estes pontos de monitoramento que apresentaram, em 2010, valores de IQA (Índice de Qualidade de águas – que analisa parâmetros tais como coliformes termotolerantes, fósforo total, oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio, turbidez e pH) entre “ruim” e “péssima”, se encontram em corpos d’água localizados próximos às capitais (São Paulo, Curitiba, Belo Horizonte, Salvador, Goiânia e Vitória) ou próximos a cidades de médio e grande porte (como Campinas e Juiz de Fora) (Agência Nacional de Águas - Brasília: ANA 2012). Foram observados alguns pontos com tendência de melhora, como em trechos dos rios Tietê, Sorocaba, Piracicaba e Paraíba do Sul em São Paulo e do rio das Velhas em Belo Horizonte. Porém, apesar disso, a tendência geral é que ocorra uma piora na qualidade das águas doces superficiais do país, devido ao grande aumento das pressões sobre os recursos hídricos sem que este fosse acompanhado por investimentos efetivos e suficientes para reverter o quadro. A principal pressão sofrida pela qualidade das águas é o lançamento de esgotos domésticos nos cursos de água, além dos lançamentos originários de atividades industriais e agropecuárias. Por outro lado, as respostas que vem sendo adotadas, tais como aprimoramento da legislação, preocupações com a melhora do monitoramento, organização dos usuários de águas e principalmente, acréscimos de investimentos destinados à implementação de ações de saneamento, podem ser apontadas como causas da melhora da qualidade da água em alguns pontos em que esta ocorreu (Agência Nacional de Águas - Brasília: ANA 2012).

No ano 2000, 189 nações firmaram o compromisso de combater a extrema pobreza e outros males da sociedade. Esta promessa foi concretizada com os 8 Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (ODM) os quais deverão ser alcançados até o ano 2015 (Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada 2010). O sétimo destes objetivos visa a garantir a sustentabilidade ambiental. A estimativa é de que o Brasil cumpra, na média nacional, todos os 8 ODM, incluindo o ODM 7 (*garantir a sustentabilidade*

ambiental). Mas este é considerado por muitos especialistas como um dos mais complexos para o país, principalmente na questão de acesso aos serviços de saneamento básico em regiões remotas e nas zonas rurais.

De acordo com o quarto Relatório de Desenvolvimento Humano (RDH, 2010), elaborado pelo Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento no Brasil (PNUD), o Brasil deverá cumprir com tranquilidade a meta de reduzir pela metade, até 2015, a proporção da população sem acesso permanente e sustentável a água potável, devendo alcançar a universalização de acesso (Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada 2010). Porém terá dificuldades em alcançar a redução em 50% da população que não possui acesso permanente e sustentável ao esgotamento sanitário. Essa meta de melhorar condições de moradia e saneamento básico ainda depende dos investimentos a serem realizados e das prioridades adotadas pelo país (Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada 2010).

O Brasil elevou sua taxa de acesso urbano à água potável de 82,3% (1992) para 91,6% (em 2008), ultrapassando a meta de 91,5% para o ano de 2015. Já no esgotamento sanitário, nas áreas urbanas, a cobertura da coleta de esgotamento sanitário por rede geral ou fossa séptica aumentou mais de 14%, subindo de 66,1% (1992), para 80,5% (em 2008). Ou seja, ainda falta cobertura adequada a 5% da população urbana, para que se atinja a meta de 85,5% estabelecida para 2015 (Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada 2010). Apesar do aumento da cobertura, a falta de uma solução adequada para o esgoto doméstico ainda atinge cerca de 31 milhões de moradores nas cidades (Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada 2010).

1.2. O esgoto

Segundo a FUNASA, visto sob o aspecto sanitário, o destino adequado dos dejetos humanos visa o controle e a prevenção de doenças a eles relacionadas. Sendo necessário evitar a poluição do solo e dos mananciais de abastecimento de água, bem como o contato de vetores com as fezes, e promovendo melhores hábitos de higiene (Fundação Nacional de Saúde, 2006). Visto sob o aspecto econômico, as doenças relacionadas à falta de condições adequadas de saneamento podem reduzir a capacidade humana para o trabalho e gerar ônus para o governo quanto a tratamentos de saúde e afastamento do trabalho (Fundação Nacional de Saúde, 2006). Dessa forma, a destinação adequada do esgoto visa a aumentar o tempo médio de vida do homem, pela

redução da mortalidade, bem como reduzir as despesas médicas com o tratamento de doenças que podem ser evitadas. Visa ainda reduzir os gastos públicos com o tratamento da água destinada ao consumo e abastecimento urbano, prevenindo a poluição dos mananciais, além de preservar a fauna aquática e controlar a poluição de praias (Fundação Nacional de Saúde, 2006).

O esgoto doméstico pode ser definido, como aquele proveniente de residências, estabelecimentos comerciais, instituições ou quaisquer edificações que dispõe de instalações de banheiros, lavanderias e cozinhas. Compõem-se essencialmente da água de banho, excretas, papel higiênico, restos de comida, sabão, detergentes e águas de lavagem (Fundação Nacional de Saúde, 2006), e apresenta retorno de 80 % da vazão da água distribuída (Von Sperling, 1996). Já a NBR 9648 (ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1986) define esgoto sanitário como o despejo líquido constituído de esgotos doméstico e industrial, água de infiltração e a contribuição pluvial parasitária. Dos quais, esgoto doméstico é o despejo líquido resultante do uso da água para higiene e necessidades fisiológicas humanas; esgoto industrial é o despejo líquido resultante dos processos industriais, respeitados os padrões de lançamento estabelecidos; água de infiltração é toda água proveniente do subsolo, indesejável ao sistema separador e que penetra nas canalizações; e a contribuição pluvial parasitária é a parcela do deflúvio superficial inevitavelmente absorvida pela rede de esgoto sanitário, ou seja, parte da água de chuva que penetra a rede coletora de esgotos.

A temperatura do esgoto é, em geral, um pouco superior à das águas de abastecimento. Sendo que a velocidade de decomposição do esgoto é proporcional ao aumento da temperatura, dentro da faixa de 25 a 35°C, ideal para atividades biológicas. Os odores característicos são causados pelos gases formados no processo de decomposição, sendo o odor de mofo, típico de esgoto fresco e o odor de ovo podre, típico do esgoto velho ou séptico, em virtude da presença de gás sulfídrico. A coloração também é um indicativo do estado de decomposição do esgoto. O tom acinzentado acompanhado de alguma turbidez é típico do esgoto fresco e a cor preta é típica do esgoto velho (Von Sperling, 1996). A vazão do esgoto depende dos costumes dos habitantes. A vazão doméstica do esgoto é calculada em função do consumo médio diário de água de um indivíduo. Estima-se que para cada 100 litros de água consumida, são lançados aproximadamente 80 litros de esgoto na rede coletora, ou seja, 80%.

1.3. Composição química do esgoto

O esgoto doméstico é, geralmente, composto por 99,9% de água e 0,1% de sólidos, tanto dissolvidos, quanto em suspensão (Jordão & Pessoa, 1995). Deste percentual de sólidos, aproximadamente 30% é de origem inorgânica, formada principalmente por areia e outras substâncias minerais inertes. Por ser inerte, geralmente esse tipo de material não é removido, pois pouco influenciará em um sistema de tratamento de esgotos. Entretanto, grande quantidade desse material pode causar entupimento e saturação de filtros e tanques (Jordão & Pessoa, 1995). Os demais 70% dos sólidos presentes no esgoto são de origem orgânica, e são, geralmente, os principais responsáveis pela deterioração da qualidade do corpo de água receptor. Os principais componentes orgânicos do esgoto são proteínas, carboidratos, gordura e óleos, que podem ser decompostos pela atividade de microrganismos. Parte dessa matéria orgânica é constituída por inúmeros organismos vivos, como bactérias, fungos, vírus, vermes e protozoários, eliminados juntamente com os dejetos humanos (Jordão & Pessoa, 1995). Estes microrganismos podem exercer o papel de degradação de parte dessa matéria orgânica, bem como servirem como indicadores de poluição (organismos cuja presença indica uma forma de poluição). Para indicação de poluição de origem humana adotam-se os organismos do grupo coliformes como indicadores. O grupo dos coliformes totais é composto por bactérias da família **Enterobacteriaceae**, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubadas a 35-37 °C por 48 horas. Esse grupo é composto predominantemente por bactérias pertencentes aos gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, que são ubíquas, podendo ser encontradas em insetos, vegetais e solo, além do trato digestivo do homem e animais. As bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes fecais ou termotolerantes, correspondem aos coliformes totais, que mantém essa capacidade fermentativa, quando incubadas à temperatura de 45°C. Nessas condições, cerca de 90% das culturas de *E. coli* são positivas, enquanto entre os demais gêneros apenas algumas linhagens de *Enterobacter* e *Klebsiella* mantém essa característica (Facchin, 2007). Os coliformes fecais são típicos do intestino humano e de outros animais de sangue quente. Estão presentes nas fezes humanas (100 a 400 bilhões de coliformes/hab.dia) e são de simples determinação. Na urina também são eliminadas algumas substâncias orgânicas, como a uréia, resultante do metabolismo de proteínas.

A demanda bioquímica de oxigênio (DBO) é uma medida da quantidade de oxigênio dissolvido necessário para degradação por microrganismos aeróbios da matéria orgânica presente em determinada amostra de água. Porém, indica, não só a quantidade de matéria orgânica biodegradável (demanda carbônica), mas também o oxigênio utilizado para oxidar matérias inorgânicas, tais como íons sulfetos e ferrosos e o oxigênio utilizado para oxidar formas reduzidas do nitrogênio (demanda nitrogenada), a menos que sua oxidação seja inibida (Liu & Mattiasson, 2002). Este teste é amplamente utilizado para avaliar a redução da carga de matéria orgânica em determinado efluente, quando da sua entrada e saída de uma estação de tratamento (Liu & Mattiasson, 2002). Geralmente, é expresso em miligramas de oxigênio consumidos por litro de amostra, durante 5 dias de incubação a 20°C (BOD₅) (Liu & Mattiasson, 2002).

1.3.1. Óleos, gorduras e enzimas lipolíticas

Segundo o Manual de Saneamento (Fundação Nacional de Saúde, 2006), os óleos e gorduras se encontram presentes nos efluentes domésticos e sua origem se deve ao uso de produtos gordurosos em culinária e oleosos em veículos automotores. São comuns em rejeitos provenientes não só de residências bem como de restaurantes, indústrias alimentícias e panificadoras (Becker *et al.*, 1999; Stoll & Gupta, 1997). Eles constituem o principal problema no processo de tratamento biológico do esgoto (Becker *et al.*, 1999). São indesejáveis em um sistema de tratamento de esgotos, pois formam uma camada espessa que pode vir a entupir filtros e encanamentos. Devido à sua natureza hidrofóbica, óleos e gorduras se aglomeram, formando uma cobertura na superfície da água, que reduz a taxa de transferência de oxigênio, por inibir sua penetração no meio aquoso (Becker *et al.*, 1999).

Óleos e gorduras têm um papel fundamental na alimentação humana. Além de fornecerem calorias, agem como veículo para as vitaminas lipossolúveis, como A, D, E e K1. Também são fontes de ácidos graxos essenciais como o linoleico, linolênico e araquidônico e contribuem para a palatabilidade dos alimentos (Karleskind, 1996; Gurr & Harwood, 1996). Os óleos vegetais contêm de 90 a 98% de triglicerídeos (**Figura 1**) e uma pequena quantidade de mono e diglicerídeos. Os triglicerídeos são ésteres com três ácidos graxos e um glicerol. Os ácidos graxos variam na extensão de suas cadeias carbônicas e no número de ligações duplas (insaturações) (Srivastava & Prasad, 2000).

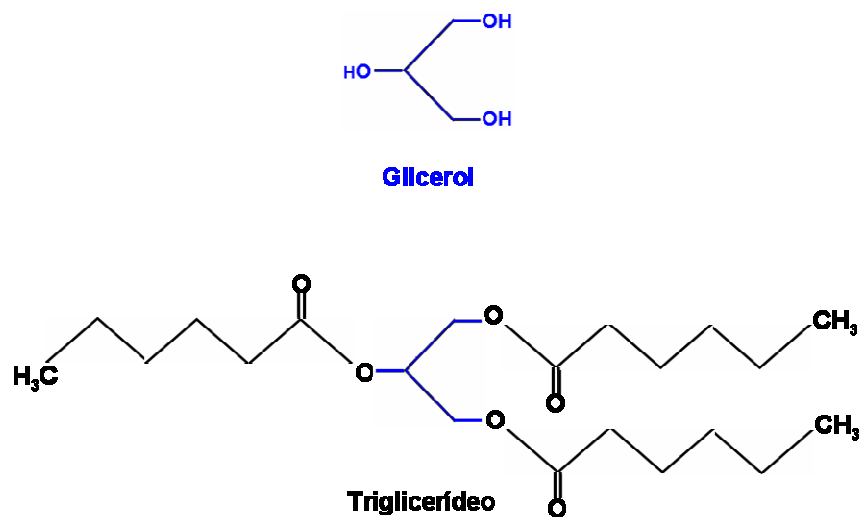


Figura 1: Fórmula estrutural de uma molécula de glicerol e de um triglicerídeo saturado de 3 cadeias éster de 6 carbonos

Enzimas lipolíticas são ubíquas, sendo largamente distribuídas entre os reinos. Esterases e lipases catalisam tanto a hidrólise quanto a síntese de acilglicerídeos (Lee *et al.*, 2004; Bradner *et al.*, 2003). Ambas são carboxilesterases (EC 3.1.1.1) e assim, têm amplo espectro de substrato sobre ésteres e tioésteres. As esterases e lipases também são hidrolases, porém enquanto a atividade das esterases está restrita à hidrólise de ligações em ésteres de cadeias curtas (menos de 10 carbonos), normalmente solúveis em água, as lipases (EC 3.1.1.3) também hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa (mais de 10 átomos de carbono) e assim, podem ser consideradas como enzimas lipolíticas e esterolíticas (Wong & Schotz, 2002). As lipases podem ser distinguidas das esterases pelo fenômeno de ativação interfacial, a qual foi unicamente observada para lipases. Enquanto as esterases obedecem à cinética clássica de Michaelis-Menten, as lipases necessitam de uma concentração mínima de substrato para que uma alta atividade possa ser observada (Bornscheuer *et al.*, 2002). Deve-se enfatizar, entretanto, que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (Tomic & Ramek, 2006; Bornscheuer *et al.*, 2002; Nini *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2001; Jaeger *et al.*, 1999; Holmquist *et al.*, 1997).

A estrutura tridimensional dessas enzimas é bastante similar, sendo membros da superfamília das α/β hidrolases (Lee *et al.*, 2004; Bradner *et al.*, 2003). A atividade de membros desta superfamília se baseia em um sítio catalítico composto da tríade serina, ácido glutâmico/aspártico e histidina, sendo também classificadas como serino-hidrolases (Côté & Shareck, 2008; Bradner *et al.*, 2003; Jaeger *et al.*, 1994). Além de

um quarto sítio conservado na região que corresponde à cavidade oxianion (*oxyanion hole*) (Jaeger *et al.*, 1994). Já foi observado que lipases tanto de origem bacteriana, archaea e eucariótica contêm a tríade catalítica característica no sítio ativo e lipases que possuem esta seqüência consenso geralmente também possuem a região oxianion localizada de 60 a 108 aminoácidos, anteriormente, ao sítio ativo (Jaeger *et al.*, 1994). E a comparação de seqüências do sítio do *oxyanion hole* revelou a presença de uma região hidrofóbica de seis aminoácidos moderadamente conservados do dipeptídeo histidina-glicina (HG) (Jaeger *et al.*, 1999). Um resíduo nucleofílico de serina, localizado em um pentapeptídeo altamente conservado GX SXG, forma um motivo característico denominado “ângulo nucleofílico” (Jaeger & Reetz, 1998).

Outro componente estrutural característico de diversas lipases é uma α -hélice denominada “tampa” que cobre o sítio ativo da enzima na ausência de substrato. Em contato com a interface lipídio-água, a enzima sofre uma mudança conformacional, essa tampa se move e o sítio ativo é exposto. A este fenômeno dá-se o nome de ativação interfacial (**Figura 2**) (Eggert *et al.*, 2002; Jaeger *et al.*, 1999; Gill & Parish, 1997). Lipases normalmente apresentam massa molecular entre 19 kDa e 60 kDa (Jaeger & Reetz, 1998). A maioria das lipases é solúvel em água e hidrolisam ligações éster de substratos insolúveis (Gilham & Lehner, 2005). Sendo assim, essas enzimas agem na interface entre a fase oleosa de substrato e a fase aquosa na qual estão dissolvidas (Bussamara *et al.*, 2010). Para liberar completamente uma molécula de glicerol das 3 cadeias acil de um triacilglicerol (**Figura 3**), muitas vezes é necessário combinar duas ou mais lipases e esta liberação raramente ocorre em decorrência da ação de um único tipo de lipase (Gilham & Lehner, 2005).

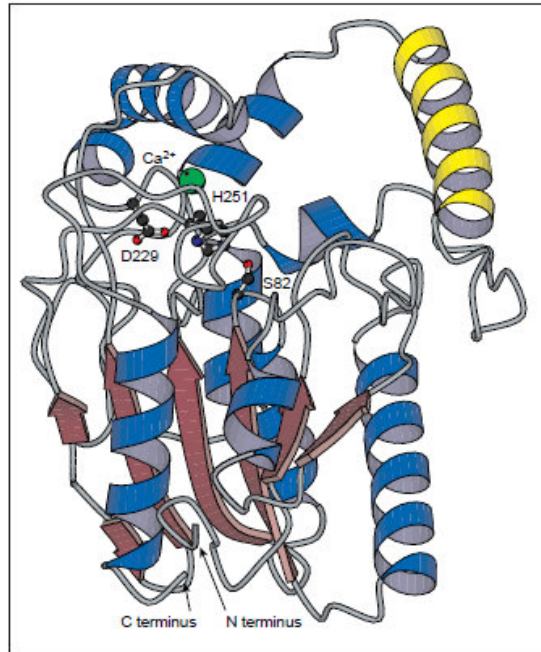


Figura 2: Estrutura de lipase de *Pseudomonas aeruginosa* baseada no modelo construído para lipase de *Burkholderia cepacia* usando o raio-X coordenado. Fitas- β são representadas como flechas (vermelho) e α -hélices como rolo (azul e amarelo); a hélice amarela pode formar uma “tampa” sobre o sítio ativo. Os resíduos do sítio ativo Ser82, Asp229 e His251 estão evidenciados, e a posição do íon Ca^{2+} é indicada pelo círculo verde (Jaeger & Reetz, 1998).

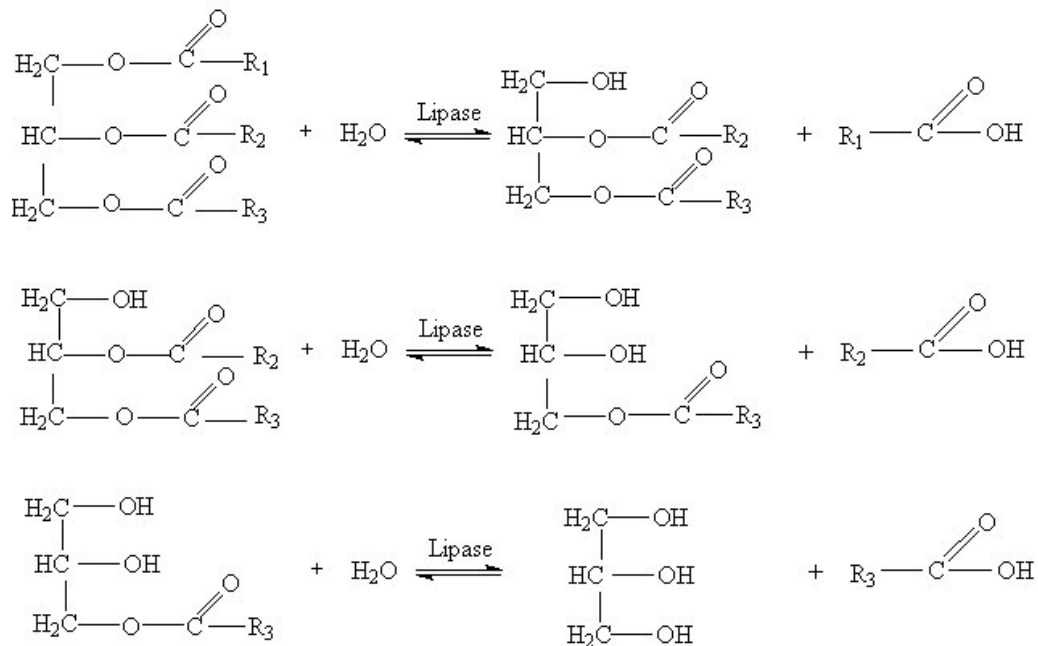


Figura 3: Hidrólise sequencial dos 3 grupamentos acila de um triglicerídeo, catalisada por lipases (Mendes & Castro, 2005).

Microrganismos produtores de lipase também podem ser encontrados em fontes contaminadas com óleos e gorduras. E assim, podem ser isolados a partir de efluentes domésticos e industriais. De outra forma, a intensa competição por fontes limitadas de carbono também poderia resultar na evolução de novos genes e/ou de novas vias bioquímicas em ambiente especializado como de efluentes com baixa concentração de carbono orgânico (Bramucci *et al.*, 2003). No presente estudo, foram isoladas lipases e outras enzimas hidrolíticas de origem microbiana, seguindo principalmente a primeira linha de raciocínio, e foi avaliada a capacidade de degradação de óleos e gorduras destas enzimas.

1.3.2. Proteínas e proteases

Proteínas são cadeias polipeptídicas compostas por aminoácidos ligados por uma ligação peptídica. São compostas por átomos de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, podendo também conter fósforo, enxofre e ferro. São geralmente de origem animal, mas também ocorrem em vegetais. O enxofre fornecido pelas proteínas presentes nos efluentes é responsável pela produção do gás sulfídrico (Sulfeto de Hidrogênio – H₂S), gás produtor de mau-cheiro mais abundante, resultante da biotransformação anaeróbica, responsável pelo odor de “ovo-podre” (Straka *et al.*, 2007; Lomans *et al.*, 2001; Lomans *et al.*, 1999).

Além de ser uma importante fonte de nitrogênio dissolvido e particulado, as proteínas constituem uma fração importante do carbono orgânico total e da matéria orgânica presente nos esgotos. Estudos que caracterizaram a matéria orgânica presente em efluentes de esgotos e águas que recebiam esgoto diretamente, após tratamento doméstico, identificaram as proteínas como um dos principais constituintes orgânicos. (Holbrook *et al.*, 2005; Drewes & Croue, 2002). Um estudo estimou entre 26 a 49% do carbono orgânico total como proteínas, na fase líquida de um bioreator de membrana e de uma estação de tratamento biológico por lamas ativadas. (Holbrook *et al.*, 2004).

Em algumas atividades industriais, as proteínas constituem uma porcentagem importante da carga orgânica descartada. Por exemplo, o componente protéico dos efluentes de uma indústria de laticínios pode corresponder a mais de 40 por cento do total da DBO (Barnett *et al.*, 1994). Outras indústrias de processamento, tais como matadouros, curtumes, processamento de pescados e certos vegetais, também produzem

águas residuais contendo quantidades significativas de proteínas, provenientes de sangue, penas e vísceras de animais e cascas de cereais. Neste contexto, é útil a aplicação de proteases microbianas no tratamento de efluentes domésticos e de indústrias de processamento de alimentos para solubilizar dejetos protéicos e reduzir a DBO em ecossistemas aquáticos (Gupta *et al.*, 2002; Ichida *et al.*, 2001).

Proteases são enzimas que catalisam a adição de uma molécula de água entre os sítios amida e éster, desfazendo uma ligação peptídica. Elas diferem enormemente em suas propriedades como especificidade de substrato, sítio ativo e mecanismo de catálise. Possuem ainda diferenças nos perfis de stress mecânico e químico, e faixa de pH e temperatura de atividade e estabilidade (Godfrey & West, 1996). Devido ao seu amplo espectro de substratos, as proteases encontram diversas aplicações, como processamento de couro, formulação de detergentes, panificação, fabricação de cerveja, amaciamento de carne, síntese de peptídeos, fabricação de queijos, produção de molho de soja, hidrolisado de proteína, indústria farmacêutica, tratamento de esgotos, síntese orgânica, e ferramentas analíticas em pesquisa básica, apresentando assim alto valor comercial (Godfrey & West, 1996). Dentre as enzimas industriais, proteases de origem vegetal, animal e microbiana constituem cerca de 60% do total de enzimas vendidas no mundo (Mehreb-Dini *et al.*, 2009; Kunamneni *et al.*, 2003).

Embora as proteases sejam amplamente distribuídas na natureza, as de origem microbiana são a fonte preferida e representam cerca de dois terços da produção comercial de proteases em todo o mundo. A atual demanda mundial de proteases gerou um interesse em proteases microbianas devido ao seu rápido crescimento, a eficiência de custos e a facilidade com que eles podem ser geneticamente modificados para gerar linhagens com alto rendimento, para produção de enzimas mais eficientes e com as propriedades desejadas para atender às necessidades de suas diversas aplicações. A maior parte das proteases comerciais é de origem bacteriana (Prakasham *et al.*, 2006). Apesar das proteases serem produzidas por várias espécies bacterianas como *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, e indivíduos dos gêneros *Flavobacterium*, *Clostridium*, *Achromobacter*, *Thermoactinomyces* e *Streptomyces*, as pertencentes ao gênero *Bacillus* são a principal fonte de proteases extracelulares solúveis (Prakasham *et al.*, 2006).

Fungos filamentosos também secretam eficientemente diferentes tipos de proteases. Sendo conhecidamente produtores de proteases neutras, alcalinas e metaloproteases, e ainda um único organismo pode produzir mais de um tipo de

protease (Lindberg *et al.*, 1982). Proteases de origem fúngica também são ativas em um amplo espectro de pH (pH 4 a 11) e exibem uma ampla gama de especificidade por substratos (Rao *et al.*, 1998). Uma das mais conhecidas é a Proteinase K, uma enzima alcalina produzida pela espécie *Engyodontium álbum* ou *Tritirachium álbum* (Kotlova *et al.*, 2007). De acordo com o *International Union of Pure and Applied Chemistry/IUPAC* (1992), as proteases são classificadas no subgrupo 4 (proteases) do grupo 3 (hidrolases) sendo denominadas EC.3.4, e a classe principal à qual pertencem seria o numeral seguinte (11 a 24). Não existe um meio universal para produção de proteases, de forma que a composição final do meio irá variar de organismo para organismo. Os fatores que mais influenciam sua produção são as fontes de carbono e nitrogênio, vitaminas e íons metálicos e ainda fatores ambientais como pH, temperatura e aeração.

Por solubilizar rejeitos protéicos, colaborando assim com a redução da DBO em sistemas aquáticos, a utilização de proteases alcalinas que tem sido adotada recentemente, na gestão dos resíduos domésticos e de várias indústrias de processamento de alimentos iniciou uma nova era na gestão de resíduos. Proteases podem ser eficientemente utilizadas para remover obstruções em tubos de drenagem. Apresentam ainda grande utilidade na conversão de resíduos gerados pelas indústrias de pescados, aves, carnes, e matadouros em produtos com valor agregado, tais como farinha de peixe, farinha de penas, e rações animais. Grandes quantidades de resíduos são geradas em forma de pêlos, penas e outros resíduos sólidos ricos em proteínas em matadouros animais. Por exemplo, as penas constituem cerca de 5% do peso corporal de um frango e com a utilização de queratinases (protease que age sobre a queratina), produtos como pelos e penas podem ser utilizados para preparar suplementos e rações para animais, aminoácidos e peptídeos (Gupta *et al.*, 2002; Kumar & Takagi, 1999).

1.3.3. Carboidratos (amido e celulose), amilases e celulasas

Carboidratos são compostos de carbono, oxigênio e hidrogênio e, geralmente, são os primeiros a sofrerem degradação por bactérias. Estão presentes nos diferentes tipos de açúcares, amido e celulose. A degradação bacteriana de carboidratos produz ácidos orgânicos, tais como o ácido acético e lático, que podem aumentar a acidez dos efluentes. Os carboidratos, freqüentemente, figuram como o principal contaminante orgânico em diversos efluentes industriais (Zhang *et al.*, 2005). Diversos processos bioquímicos podem produzir bioenergia e/ou compostos químicos com valor agregado

enquanto, simultaneamente, reduz a carga de carboidratos e conseqüentemente a DBO de um dado rejeito industrial. Indústrias que constituem candidatos ideais para esse tipo de manejo são as indústrias de processamento de alimentos e cervejarias, bem como efluentes agrícolas de criações animais em confinamento, pois possuem altos níveis de matéria orgânica facilmente degradável, o que resulta em equilíbrio econômico, mesmo quando é necessário aquecer o rejeito (Angenent *et al.*, 2004). Estes rejeitos são *commodities* em potencial a partir dos quais é possível produzir bioenergia e biocompostos, e assim reduzir o custo do tratamento de águas residuais, e ainda reduzir a dependência dos combustíveis fósseis (Angenent *et al.*, 2004).

O amido é o principal polissacarídeo de armazenamento energético presente em grãos, cereais e tubérculos. Os dois principais componentes do amido são polímeros de glicose: amilose – uma molécula essencialmente linear e amilopectina – uma molécula altamente ramificada. A proporção entre amilose e amilopectina, além de outros componentes como lipídeos, proteínas e fosfatos, varia na composição do amido de diferentes tubérculos como milho, mandioca, batata e trigo (Souza & Magalhães, 2010).

As α -amilases (E.C.3.2.1.1) são enzimas que catalisam a hidrólise de moléculas de amido em polímeros progressivamente menores, compostos de moléculas de glicose (Windish & Mhatre, 1965). Atualmente, a utilização de amilases microbianas já substituiu, quase completamente, a hidrólise química do amido. As principais vantagens de utilizar microrganismos para produção de amilase são a produção em massa e a facilidade de manipulação do microrganismo para obter a enzima com as características necessárias. Adicionalmente, a estabilidade das amilases microbianas é superior às de origem animal e vegetal (Tanyildizi *et al.*, 2005).

Celulose é o composto orgânico mais abundante do planeta, sendo o principal componente estrutural das plantas e podendo também ser encontrado em bactérias, fungos e algas. A celulose é um polímero linear de glicose, que apresenta estrutura cristalina, na qual ligações de hidrogênio intra e inter-cadeia mantêm a estrutura rígida e cadeias adjacentes se mantêm unidas por ligações de Van-der Waals (**Figura 04**). (Sukumaran *et al.*, 2005). Na natureza, as fibras de celulose geralmente encontram-se incorporadas em uma matriz de hemicelulose ou lignina (Lynd *et al.*, 1999; Marchessault & Sundararajan, 1993). A lignocelulose é de difícil desmembramento, sendo necessária a ação sinérgica de 3 diferentes enzimas para sua completa degradação (Karmakar & Ray, 2011). Por ser o principal rejeito da agricultura, muita atenção tem se voltado para as enzimas capazes de degradar a celulose com objetivo de produzir

bioetanol, o que concomitantemente iria aliviar o rejeito de matéria orgânica nos efluentes das atividades agrícolas.

Celulases são enzimas indutíveis, sintetizadas por diversos microrganismos, principalmente fungos e bactérias. Efetivamente, a celulase é uma família composta por pelo menos 3 grupos de enzimas, endo-(1,4)- β -D-glucanase (EC 3.2.1.4); exo-(1,4)- β -D-glucanase (EC 3.2.1.91); β -glucosidases (EC 3.2.1.21) (Kuhad *et al.*, 2011). As endoglucanases atuam nas carboximetilceluloses, promovendo a quebra randômica das ligações *O*-glycosídicas internas, resultando em cadeias glucano de diferentes comprimentos. As exoglucanases atuam nas pontas das cadeias de celulose, liberando β -celobiose como produto final. Já as β -glicosidases agem especificamente sobre dissacarídeos de β -celobiose, liberando moléculas de glicose (Karmakar & Ray, 2011) **(Figura 4)**.

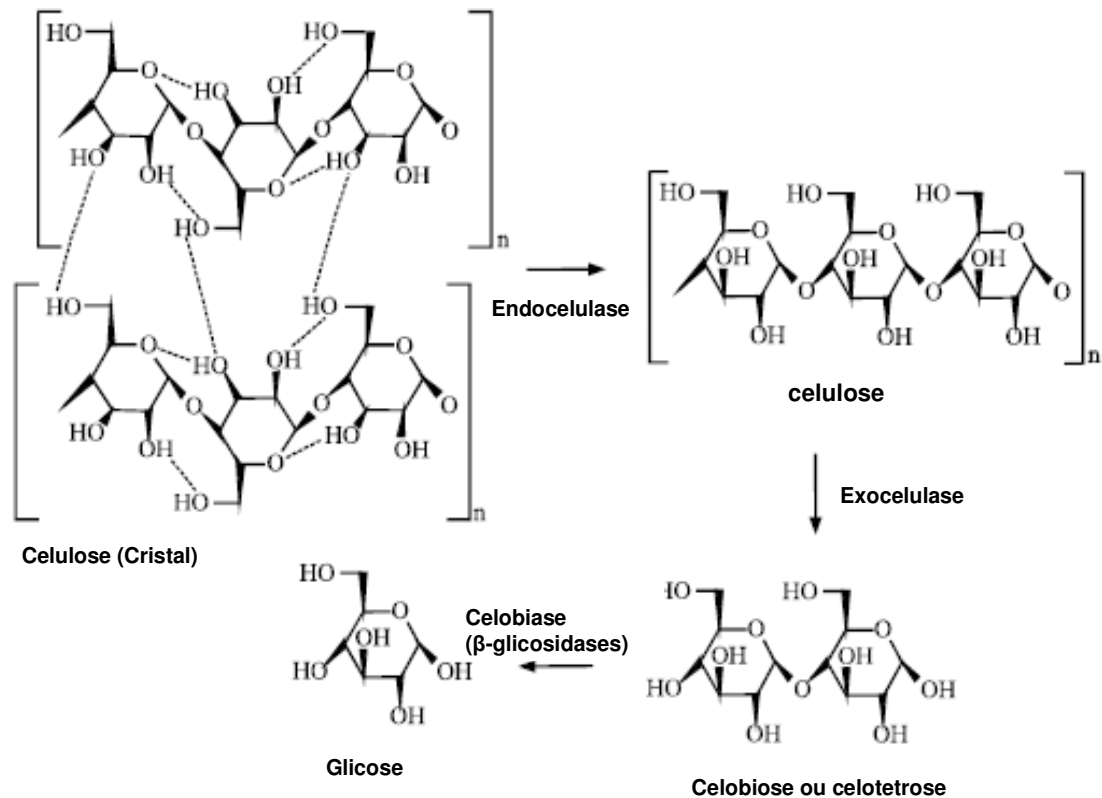


Figura 4: Arranjo cristalino do polímero de celulose e ação sinérgica dos 3 grupos de celuloses: endoglucanases, exoglucanases e β-glicosidases para liberação de moléculas de glicose. (modificado de Karmakar & Ray, 2011)

Celulases de origem microbiana são amplamente utilizadas nas indústrias de papel, vinho, ração animal e têxtil, bem como para produção de biocombustível, processamento de alimentos vegetais tais como suco de frutas, extração de óleo de oliva e carotenóides, além de manejo de efluentes (Gupta *et al.*, 2011a). Os efluentes gerados em agroindústrias e campos de plantio contêm grande quantidade de celulose não utilizada, o que acaba gerando poluição ambiental caso o descarte não seja adequado. Atualmente, porém, estes rejeitos podem ser utilizados para produção de derivados com elevado valor agregado, como enzimas, açúcares, biocombustíveis e outros compostos químicos (Gupta *et al.*, 2011a; Gupta *et al.*, 2011b; Kuhad *et al.*, 2010).

1.4. O tratamento de esgoto

Por mais de um século, o tratamento biológico de esgotos tem sido utilizado como forma de minimizar os danos antrópicos ao ambiente. Isto é particularmente

imprescindível nas áreas urbanas onde a aglomeração de pessoas inviabilizaria a vida saudável caso não se tomasse medidas para reduzir os contaminantes nos efluentes domésticos e comerciais. A composição e atividade da comunidade microbiana em uma estação de tratamento de esgotos desempenham um papel primordial na eficiência do processo de purificação da água (Wagner *et al.*, 2002). A eficiência do processo biológico convencional de tratamento de esgotos sofre redução pela presença de altas concentrações de óleos e graxas nos efluentes (Perle *et al.*, 1995). No processo de lamas ativadas, altas concentrações de óleos e gorduras provocam uma redução na atividade biológica dos flocos, pela dificuldade encontrada pelo oxigênio e substrato em penetrá-los, devido à barreira formada pelo filme de óleo ao redor destes flocos (Lefebvre *et al.*, 1998). Já no caso da digestão anaeróbica, quantidades excessivas de óleo e gordura inibem a ação das bactérias acetogênicas e archeas metanogênicas (Masse *et al.*, 2001; Vidal *et al.*, 2000; Perle *et al.*, 1995). O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA 357 - Conselho Nacional do Meio Ambiente 2005) estabelece a concentração máxima de óleo mineral permitido para efluentes que deságuam em corpos de água em 20 mg/l, e a concentração máxima de óleos vegetais ou gordura animal em 50 mg/l (CONAMA 357 - Conselho Nacional do Meio Ambiente 2005).

Os métodos tradicionais para tratamento de efluentes oleosos incluem separação por gravidade, flotação por ar dissolvido (Tecnologia DAF – *Dissolved Air Flotation*), de-emulsificação, coagulação e floculação (Cheryan & Rajagopalan, 1998). O óleo livre é removido das águas residuárias por separação pela gravidade. Esse processo, no entanto não é eficiente na remoção de pequenas gotículas de óleo e óleo emulsificado (Cheryan & Rajagopalan, 1998). O óleo que se adere à superfície de partículas sólidas pode ser removido por sedimentação dessas partículas (Cheryan & Rajagopalan, 1998). A tecnologia DAF utiliza ar solubilizado para aumentar a flutuabilidade das menores gotículas de óleo e otimizar a separação (Cheryan & Rajagopalan, 1998). Por fim, o óleo emulsificado é removido por processos químicos ou térmicos de de-emulsificação, ou ambos (Cheryan & Rajagopalan, 1998). No processo de de-emulsificação térmico, a água de esgoto contendo óleo emulsificado é aquecida para reduzir a viscosidade, acentuar as diferenças de densidade e enfraquecer os filmes interfaciais, estabilizando a fase oleosa. Em seguida, a acidificação e a adição de um polímero catiônico neutralizam as cargas negativas, e a elevação do pH para faixa alcalina induz a floculação de sais inorgânicos. Os flocos adsorvidos com o óleo são separados e a lama é desidratada (Cheryan & Rajagopalan, 1998). Neste contexto, a utilização de microrganismos

lipolíticos para o tratamento de esgoto poderia eliminar todo este processo de pré-tratamento para eliminação do óleo (Bhumibhamon *et al.*, 2002). Chigusa e colaboradores (1996) demonstraram a redução em 94% na quantidade de gordura presente em águas residuais tratadas com uma cultura mista de nove linhagens de levedura produtoras de lipase.

Enzimas hidrolíticas, tais como lipases, amilases e proteases, têm aplicação promissora no tratamento de efluentes indústrias de doces, sorvetes, laticínios e carnes. Enzimas destinadas ao tratamento de esgotos não necessitam purificação, e assim, apresentam custo de produção reduzido em relação a outras aplicações (Rigo *et al.*, 2008) Estas características levaram a um crescente interesse na tecnologia de produção de enzimas e na busca de microrganismos com capacidade variada de produzir enzimas (Leal *et al.*, 2006; Cavalcanti *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2002; Mongkoltharuk & Dharmstithi, 2002).

Atualmente, existem inúmeros processos para o tratamento de esgoto. A decisão sobre qual deve ser empregado, de forma individual ou combinado, deve levar em consideração, principalmente as condições do curso d'água receptor (autodepuração e limites definidos pela legislação ambiental) e as características do esgoto bruto. É necessário certificar-se da eficiência de cada processo unitário e de seu custo, além da disponibilidade de área (Imhoff & Imhoff, 1996). O tratamento de esgoto é usualmente classificado da seguinte forma segundo COPASA – Companhia de Saneamento de Minas Gerais (2012):

- **Tratamento preliminar:** objetiva a remoção de sólidos grosseiros e areia, por mecanismos físicos, como gradeamento, peneiramento e a sedimentação;

- **Tratamento primário:** visa à remoção de sólidos flutuantes (graxas e óleos) e sedimentáveis e, conseqüentemente parte da matéria orgânica, por mecanismos físicos. Esses sólidos se sedimentam, indo para o fundo dos decantadores, formando o lodo primário bruto. Esse lodo é retirado do fundo do decantador, através de raspadores mecanizados, tubulações ou bombas;

- **Tratamento secundário:** predominam mecanismos biológicos, com objetivo de remover matéria orgânica e nutrientes (nitrogênio e fósforo). O efluente se encaminha para o filtro anaeróbio que possui bactérias que crescem aderidas a um suporte formando a biomassa, que reduz a carga orgânica dos esgotos. Nesta etapa, são formados gases – metano e carbônico, resultantes do processo de fermentação anaeróbia. O efluente segue então para um tanque de aeração, no qual, através de

processos biológicos, bactérias aeróbias, facultativas, protozoários e fungos se alimentam da matéria orgânica presente, convertendo-a em gás carbônico, água e material celular. Esta decomposição biológica do material orgânico requer a presença de oxigênio e outras condições ambientais adequadas como temperatura, pH e tempo de contato;

- **Tratamento terciário:** objetiva a remoção de poluentes específicos (compostos tóxicos ou não biodegradáveis) e a remoção complementar de poluentes não suficientemente removidos no tratamento secundário. Nesta etapa, lagoas construídas de forma simples recebem os esgotos, que entram em uma extremidade e saem na oposta. A matéria orgânica, formada de sólidos em suspensão, fica no fundo da lagoa, formando um lodo que vai aos poucos sendo estabilizado. O processo se baseia nos princípios da respiração e da fotossíntese: As algas existentes no esgoto, na presença de luz, produzem oxigênio que é liberado na fotossíntese. Esse oxigênio dissolvido (OD) é utilizado pelas bactérias aeróbias (respiração) para se alimentarem da matéria orgânica em suspensão presente no esgoto. O resultado é a produção de sais minerais e de gás carbônico. Por fim, o material remanescente continua com alta concentração de microorganismos, passa por um processo de cloração (adição de cloro), que reduz a população remanescente de microrganismos.

A remoção de nutrientes e de organismos patogênicos pode ser considerada como parte do tratamento secundário ou do tratamento terciário, dependendo do processo adotado.

1.4.1. Biossurfactantes no tratamento de efluentes

Biossurfactantes são moléculas anfifílicas, ou seja, possuem ambos os domínios polar (hidrofílico) e apolar (lipofílico) e apresentam propriedades tensoativas. Existem dois tipos principais: (i) aqueles que reduzem a tensão superficial na interface ar-água (biossurfactantes), e (ii) aqueles que reduzem a tensão interfacial entre líquidos imiscíveis ou na interface sólido-líquido (bioemulsificantes) (Luna *et al.*, 2012; Batista *et al.*, 2010). Biossurfactantes geralmente exibem capacidade de emulsificação, mas bioemulsificantes não necessariamente reduzem a tensão superficial (Luna *et al.*, 2012; Batista *et al.*, 2010). Essas moléculas são sintetizadas por microrganismos, tanto aderentes à membrana plasmática, quanto secretadas e podem ser de diferentes tipos: lipopeptídeos (sintetizadas por muitas espécies de *Bacillus*), glicolipídeos (sintetizados

por *Pseudomonas* sp. e *Candida* sp.), fosfolipídeos (sintetizados por *Thiobacillus thiooxidans*) e complexos polisacarídeos-lipídeos (sintetizados por *Acinetobacter* sp.) (Moussa *et al.*, 2006; Nitschke & Pastore, 2006; Anyanwu & Chukwudi, 2010; Gharaei-Fathabad, 2011).

A emulsificação dos lipídeos pela decomposição das micelas favorece a ocorrência de hidrólise, uma vez que as enzimas solúveis em água terão maior superfície de contacto com o substrato a ser hidrolisado. Biossurfactantes naturais exibem baixa toxicidade e boa biodegradabilidade e aceitabilidade ecológica, fornecendo uma alternativa para surfactantes químicos convencionais. Em contraste aos surfactantes químicos, geralmente derivados do petróleo, os biossurfactantes podem ser produzidos por processos fermentativos microbianos, a partir de vários substratos renováveis, tais como óleos vegetais e rejeitos de destilaria e laticínios (Abouseoud *et al.*, 2007; Gharaei-Fathabad, 2011). Ecologicamente o papel dos biossurfactantes inclui aumento da superfície de contato e biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos insolúveis em água, ligação a metais pesados, patogênese microbiana e formação de biofilme (Gharaei-Fathabad, 2011). Eles são aplicáveis economicamente para proteção ambiental, biorremediação de solo, gestão de resíduos (Van Dyke *et al.*, 1991), recuperação de óleo bruto, limpeza de águas subterrâneas contaminadas com hidrocarbonetos (Ron & Rosenberg, 2001), agentes antimicrobianos na saúde, inibidores da formação de coágulos de fibrina, ação anti-adesiva contra microrganismos patogênicos (Moussa *et al.*, 2006), e ainda uma grande variedade de processos industriais que envolvem emulsificação, formação de espuma, detergência, umidificação, dispersão ou solubilização (Desai & Banat, 1997).

Um dos biossurfactantes mais conhecidos é a surfactina, descrita pela primeira vez em 1968 por Arima e colaboradores, em cultura de *Bacillus subtilis*. É um lipopeptídeo, estruturalmente formado por um peptídeo cíclico de 7 aminoácidos ligado a uma cadeia de ácidos graxos, composta por 13 a 16 carbonos (**Figura 5**), com excepcional poder surfactante. Concentrações de surfactina tão baixas quanto 0,005% são capazes de reduzir a tensão superficial da água a 27 mN/m, o que faz desse biossurfactante um dos mais poderosos. Devido à presença de duas cargas negativas, como indicado na **Figura 5**, uma no aspartato e a outra no resíduo de glutamato, a ligação de metais pesados, magnésio, manganês, cálcio, bário, lítio e rubídio tem sido demonstrada utilizando surfactina de *Bacillus subtilis* para a biorremediação de solo contaminado e sedimentos (Mulligan, 2005). A surfactina também apresenta atividade

fisiológica, inibindo a formação de coágulos de fibrina, como agente antibacteriano, antitumoral e hipocolesterolêmico (Lang, 2002; Peypoux *et al.*, 1999). Exerce sua atividade biológica alterando a integridade da membrana plasmática, interagindo com os fosfolípidos estruturais.

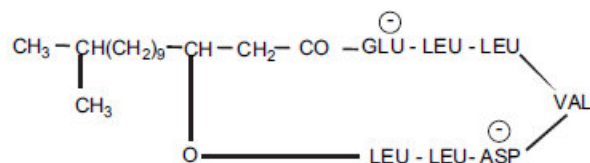


Figura 5: Estrutura da surfactina (Mulligan, 2005)

A principal desvantagem de utilizar biossurfactantes é o seu custo mais elevado que dos tensoativos sintéticos, como o alquil benzeno, derivado de petróleo, utilizado na fabricação de dodecil benzeno sulfonato de sódio, base de inúmeros sabões em pó para lavagem de roupas. Uma alternativa para reduzir os custos de produção seria a utilização de substratos baratos e microrganismos altamente eficientes. Nesse sentido, utilizar rejeitos industriais ricos em carboidratos e lipídeos como meio de cultivo para microrganismos e produção de biossurfactantes consiste em uma tecnologia barata, limpa e que ainda geraria um crédito de benefício ambiental, no contexto de aprimoramento no manejo de rejeitos, pelo conceito: reduzir, reutilizar e reciclar (Plaza *et al.*, 2011). A reutilização de rejeitos orgânicos como matéria prima para produção de um subproduto de origem microbiana que apresenta menor toxicidade e melhor aceitabilidade ecológica do que seu análogo derivado de petróleo configura um ganho ambiental. Desde que utilize como matéria prima rejeitos industriais, a produção de biossurfactantes tem o custo bem reduzido em relação aos produtos sintéticos, e pode ser facilmente implantada *in situ* em locais onde efluentes ricos em matéria orgânica seriam descartados (Makkar & Rockne, 2003). Makkar e Cameotra (1997) descreveram a utilização de melão de cana, subproduto da indústria de açúcar para cultura e estimulação de bactérias produtoras de biossurfactantes.

Surfactantes convencionais, derivados de petróleo, são tóxicos a seres humanos, peixes e vegetais, recalcitrantes à biodegradação, causam espumas em rios e estações de tratamento, reduzem a qualidade da água e podem causar alterações ambientais a curto e longo prazo (Aboulhassan *et al.*, 2006; Makkar & Rockne, 2003). Além de serem produzidos apenas à partir de matérias primas sintéticas, o que encarece e dificulta a produção no local, além de produzir substâncias tóxicas que são descartadas (Makkar &

Rockne, 2003). Por este motivo, deve-se evitar a utilização de surfactantes sintéticos para o tratamento de efluentes. A desagregação da estrutura superficial da água a deixa vulnerável a infiltração de outros contaminantes. Quando tensoativos estão dissolvidos na água, podem ser absorvidos pelo solo, causando danos às plantas e organismos associados, porém são muito utilizados na composição de produtos de limpeza, para emulsificar e dispersar óleo e gordura. Quando efluentes contendo óleo e gordura entram em contato com estes emulsificantes e outras enzimas, em seu trajeto até as estações de tratamento, ocorre a coagulação das partículas que congestionam os encanamentos. Este material pode se acumular e obstruir as tubulações. Eventualmente, estes ductos vão deteriorar e romper, sendo necessária sua substituição, além de mão-de-obra e equipamentos para efetivar o reparo.

O efeito tóxico dos surfactantes convencionais já foi descrito por diversos pesquisadores. O oceanógrafo Edison Barbieri, do Instituto de Pesca da Secretária de Agricultura do Estado de São Paulo, publicou dois trabalhos (Barbieri, 2005; Barbieri *et al.*, 2000) nos quais descreve o efeito tóxico do Dodecil Benzeno Sulfonato de Sódio Linear (Barbieri, 2005) sobre duas espécies de peixes, *Cyprinus carpio* e *Mugil platanus*. Nesses estudos ele descreve o estresse respiratório e cardíaco causado nessas espécies de peixes devido ao aumento da concentração de LAS-C12 na água. O tratamento biológico de esgotos sanitários contendo surfactantes convencionais por processos como o de lamas ativadas também é problemático devido à cinética lenta de degradação e à formação de espumas (Aboulhassan *et al.*, 2006). Como os surfactantes convencionais apresentam fortes propriedades de adsorção, as moléculas podem absorver aos flocos em lodos ativados. E esta adsorção, bem como, como a toxicidade, afeta a atividade biológica de microrganismos, o que resulta na diminuição da eficiência do tratamento de águas residuais (Aboulhassan *et al.*, 2006). O estudo de Dhouib e colaboradores (2003) exemplifica esses distúrbios causados ao tratamento biológico de efluentes em uma indústria de cosméticos pela presença de altas concentrações de surfactantes sintéticos. No estudo, os pesquisadores descrevem que ocorreu inibição significativa do crescimento microbiano além de ser visualizada formação de espuma. A solução para esta situação seria a utilização de uma linhagem bacteriana com elevada capacidade de degradação de surfactantes no tratamento biológico deste tipo de efluentes, tal como a *Citrobacter braakii* que foi isolada por eles. Esta linhagem, quando pré-incubada utilizando apenas surfactantes aniônicos como fonte de carbono, promovia uma melhor cinética de degradação dos rejeitos (Dhouib *et al.*, 2003).

Efluentes oleosos podem ainda passar pelo pré-tratamento para redução da quantidade de gordura a fim de atender à resolução do CONAMA, mas a adoção dessas medidas depende dos custos da enzima lipolítica (Alberton *et al.*, 2010). Muitos processos industriais exigem a decomposição das partículas sólidas e a prevenção do entupimento, devido ao acúmulo de gorduras no sistema de descarte ou mesmo a formação de filme de gordura na superfície dos efluentes antes da liberação do esgoto no sistema de recolhimento. Esta decomposição pode ser alcançada (1) pela degradação dos polímeros orgânicos com uma mistura comercial de enzimas lipase, celulase, amilase e protease, além de nutrientes inorgânicos; ou (2) pelo tratamento dos efluentes e limpeza dos tanques de retenção, tanques sépticos e caixas de gordura. O complexo WW07P, produzido pela Environmental Oasis Ltd. é composto por uma gama de microrganismos hidrolíticos de alta performance adaptados para o uso no tratamento biológico de esgotos contendo altos teores de gorduras e óleos. O complexo também possui surfactantes, capazes de liquefazer grossos depósitos de gordura, contribuindo para sua degradação (Environmental Oasis Ltd, 2012).

A empresa Natural Environmental Systems, llc (Dallas/Texas/EUA) é um fornecedor global de produtos microbianos naturais e outras soluções ecologicamente corretas, usados em uma ampla variedade de aplicações comerciais, industriais, agrícolas e residenciais, oferecendo uma alternativa biológica a produtos químicos perigosos e solventes cáusticos (Natural Environmental Systems, 2012). Esses produtos são compostos por bactérias não-patogênicas selecionadas para promover a degradação de resíduos orgânicos em águas residuais, lagoas e lagos, solo (biorremediação e condicionamento do solo), bem como controlar odores associados com resíduos orgânicos. Produtos contendo bactérias fermentadoras podem chegar a atingir a conversão completa de resíduos orgânicos em gás carbônico e água. Com os avanços da produção industrial e em laboratório, os produtos compostos por bactérias podem ser encontrados em diferentes formatos, permitindo diversas formas de uso em linhas de drenagem, controle de odor, manutenção caixa de gordura e tratamento fossa séptica. Estes produtos estão disponíveis em forma de pó solúvel, que facilita o armazenamento, a dosagem precisa e reduz os custos de transporte; blocos de dissolução lenta, que podem ser simplesmente suspensos no esgoto, em uma caixa de gordura, subestação coletora, ou similar. Estes blocos se dissolvem lentamente ao longo de várias semanas, liberando continuamente as bactérias com o mínimo envolvimento de funcionários ou empresas de manutenção. E ainda, podem ser encontrados em forma líquida, que, segundo o

fabricante é o formato mais conhecido e que pode ser utilizado em praticamente qualquer situação (Natural Environmental Systems, 2012).

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A importância da sustentabilidade nas atividades produtivas tem sido reconhecida havendo a necessidade da substituição de processos químicos baseados em insumos não renováveis por processos químicos ou bioquímicos que utilizem insumos renováveis. A possibilidade de se utilizar rejeitos industriais como matéria prima para produção de biocombustíveis, rações animais e outros produtos torna-se um processo duplamente vantajoso, primeiro por reduzir o impacto antrópico ao meio ambiente, devido ao descarte de efluentes com grandes concentrações de matéria orgânica e segundo por fazer deste efluente uma forma de gerar recursos, agregando valor ao produto final. O aumento da preocupação com o meio ambiente e, em especial, com o uso dos recursos hídricos resultou na valorização da água como bem de consumo e tem levado os órgãos de controle ambiental a revisar a legislação em vigor e estipular limites mais rigorosos para o descarte de efluentes industriais. Por outro lado, com o aumento da população e do impacto resultante da aglomeração humana nas cidades e, conseqüentemente, a deterioração dos recursos hídricos, provocando escassez de água, a necessidade da reutilização das águas residuárias, industriais ou domésticas, têm motivado a pesquisa por novas e melhores alternativas tecnológicas de tratamento para o reaproveitamento de águas. Concomitantemente, avanços tecnológicos têm tornado viável a aplicação de processos biotecnológicos no tratamento e reaproveitamento de efluentes contendo, entre outros poluentes e contaminantes, óleos, corantes e metais pesados. Sendo assim, prevê-se um aumento significativo do consumo de enzimas em nível nacional e internacional.

Partindo da necessidade crescente e recentemente apontada pelos órgãos governamentais e não governamentais citados acima, este estudo foi elaborado visando a biodegradação de esgotos industriais, domésticos e agro-industriais, utilizando como ferramentas biotecnológicas enzimas hidrolíticas e linhagens microbianas multidegradativas selecionadas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Isolar microrganismos lipolíticos a fim de explorar sua diversidade enzimática para degradação de substratos comumente presentes em esgotos domésticos e industriais, como forma de se obter lipases, proteases, amilases e celulases com propriedades específicas, para futuras aplicações em sistemas de pré-tratamento de efluentes.

3.2. Objetivos específicos

- Explorar a microbiota brasileira de forma a se isolar microrganismos lipolíticos;
- Caracterizar o perfil enzimático desses microrganismos, identificando quais também são produtores de proteases, amilases, celulases e biossurfactantes;
- Produzir em pequena escala extrato lipolítico de cada um dos microrganismos isolados;
- Caracterizar quanto à especificidade, resistência e condições ótimas de atividade as lipases isoladas;
- Identificar os microrganismos isolados;
- Avaliar a influência da pré-ativação na atividade lipolítica dos microrganismos selecionados;
- Avaliar a interação sinérgica de duas linhagens selecionadas, na capacidade degradativa da ação conjunta de um biossurfactante e uma enzima lipolítica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem

Microrganismos lipolíticos foram coletados randomicamente em ambientes aquáticos e terrestres, seguindo duas linhas de raciocínio: a) em locais onde existe muito lipídio disponível, provavelmente haverá diversos microrganismos produtores de lipase; b) em locais com escassa disponibilidade de lipídio, caso exista algum microrganismo capaz de metabolizar lipase, ele poderá fazê-lo com a máxima eficiência, de forma a aproveitar ao máximo o lipídio que por ventura ocorra no local. Seguindo essas duas linhas de raciocínio, nosso grupo coletou mais de 100 amostras brutas, em quatro estados brasileiros, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Amapá e Pernambuco, das quais foram isolados mais de 800 morfotipos lipolíticos distintos, os quais foram catalogados, identificados e armazenados em nosso banco de microrganismos com potencial biotecnológico mantido na empresa Phoneutria Biotecnologia.

Deste banco, foram selecionados 35 morfotipos com base no local de onde foram coletados para realização deste trabalho de doutorado. Essas amostras foram obtidas nos seguintes locais: (A) Caixa de gordura de uma casa de campo localizada na região de Macacos, distrito de Nova Lima/MG. Casa um pouco afastada da região central do distrito de Macacos, próxima a um córrego; (B) Águas residuárias de uma indústria de laticínios situada na zona rural da cidade de Crucilândia/MG a aproximadamente 3 km da localidade C. É uma pequena indústria que processa o leite produzido nas fazendas do município e vende produtos como iogurtes, manteiga e queijos principalmente nas mercearias e padarias da região. Já foi autuada 3 vezes pelo ministério da agricultura por comercializar produtos com qualidade duvidosa, e por mais de uma vez foi flagrada despejando rejeito industrial sem tratamento nas águas do rio que passa pela região; (C) Caixa de gordura de uma casa residencial também localizada na zona rural da cidade de Crucilândia/MG, a cerca de 15 Km do centro e distante 300 m de um rio. Não existem outras casas nas proximidades, num raio de 1 km; (D) Águas residuárias de uma indústria de biotecnologia situada na cidade de Belo Horizonte/MG, na região da Pampulha, em uma área de cerca de 400 m². A empresa produz e comercializa para todo território nacional, enzimas e insumos para biologia molecular.

As amostras da água das caixas de gordura eram coletadas cerca de 5 cm abaixo da camada de gordura superficial, local no qual provavelmente estaria concentrado a maior concentração de microrganismos metabolizadores de gordura.

4.1.1 Seleção de microrganismos produtores de lipase utilizando tributirina como substrato

Amostras brutas coletadas das caixas coletoras de esgoto, ou suas diluições decimais em água destilada estéril, foram inoculadas por espalhamento sobre placas de Petri contendo ágar Spirit Blue (Himedia, Mumbai/Índia) suplementado com 3% v/v de emulsão de tributirina (20% v/v de tributirina líquida e 0,2% v/v de tween 80 em água destilada). Após a incubação a 25°C por 1-5 dias, colônias representantes de cada morfotipo que apresentou atividade lipolítica foram isoladas e purificadas por estriamento no mesmo meio de cultura. Os isolados foram então, mantidos em meio LB caldo (g/l: peptona 10,0; extrato de levedura 5,0; cloreto de sódio 5,0), suplementado com 50% de soro fetal bovino, e armazenados em freezer a -80 °C.

4.2. Perfil enzimático

Para análise do perfil enzimático, cada isolado foi inoculado separadamente em 2 ml de caldo LB em uma placa de 96 poços e incubado sob agitação de 30 hz durante 24 horas a 25 °C. 2 µl de cada cultura foram inoculados sobre os seguintes meios sólidos (**Figuras 6 a 11**), utilizando uma pipeta multicanal; a formulação de todos os meios de cultura foi adaptada a partir de (Vuong *et al.*, 2000):

- 1) Agarose Tributirina (1% p/v agarose; 50 mM Tris-HCl pH 6,8; 1 mM CaCl₂; 0,6% v/v tributyrin) para detecção de atividade lipolítica (**Figura 6**).
- 2) Agarose Caseína (1% p/v agarose, 1 mM CaCl₂; 10% v/v de solução de caseína a 10 % p/v em PBS 1 X pH 7,4) para detecção de atividade proteolítica sobre a caseína (**Figura 7**).
- 3) Agarose amido de milho (1% p/v agarose; 50 mM Tris-HCl pH 6,8; 1 mM CaCl₂; 0,5% p/v amido de milho) para detecção de atividade amilásica (**Figura 8**).
- 4) Agarose Carboximetilcelulose (1% p/v agarose; 50 mM Tris-HCl pH 6,8; 1 mM CaCl₂; 0,5% p/v carboximetilcelulose) para detecção de atividade celulásica – modificado a partir de (Akhtar *et al.*, 2008) (**Figura 9**).

5) Meio de gelatina – teste realizado em tubos de ensaio contendo 2 ml de meio por tubo. (50 mM Tris-HCl pH 6,8; 1 mM CaCl₂; 10% p/v gelatina) para detecção de atividade proteolítica específica sobre a gelatina (**Figura 10**).

Após 24 horas de incubação a 25 °C foi realizada a leitura das atividades enzimáticas pela visualização de formação de um halo claro ao redor da cultura, com exceção do meio de número 5, como descrito abaixo. A relação do diâmetro do halo/diâmetro da colônia era um indicativo da capacidade hidrolítica daquele microrganismo frente ao substrato presente no meio de cultura. A presença de atividade lipásica no meio 1 (Agarose tributirina) foi visualizada por análise direta. Os meios de número 2 a 4 necessitavam de revelação previamente à análise dos resultados, que novamente eram evidenciados pela presença de um halo:

- Meio 2- (Agarose caseína) 2 minutos de incubação com solução de HCl 1N. Essa solução provoca a precipitação da caseína remanescente (**Figura 7**).
- Meio 3- (Agarose amido de milho) 2 minutos de incubação com solução de iodo a 2%, o qual se liga ao amido remanescente, apresentando uma coloração azulada (**Figura 8**).
- Meio 4- (Agarose Carboximetilcelulose) 30 minutos de incubação com solução de Vermelho Congo (0,25 % p/v em Tris-HCl 0,1 M pH 8,0), seguida por 5 minutos de incubação em solução descolorante (NaCl 0,5 M; Tris-HCl 0,1 M pH 8,0) (Ruegger & Tauk-Tornisielo, 2004) (**Figura 9**).

O meio 5, em que cada isolado foi inoculado separadamente em um tubo de ensaio, a liquefação do meio de gelatina evidenciava a produção de protease específica (**Figura 10**).

Para avaliar a capacidade dos isolados emulsificarem óleos complexos, 200 µl de cultura com DO₆₀₀ = 0,5 foram inoculados em 35 ml de meio LB líquido, suplementado com 2% de óleo de soja e 1 mM de CaCl₂. A cultura foi então, incubada por até 35 dias a 37°C e 250 rpm de agitação. Quando ocorria a emulsificação do óleo de soja no meio de cultura, este adquiria aparência e consistência leitosas (**Figura 11**).

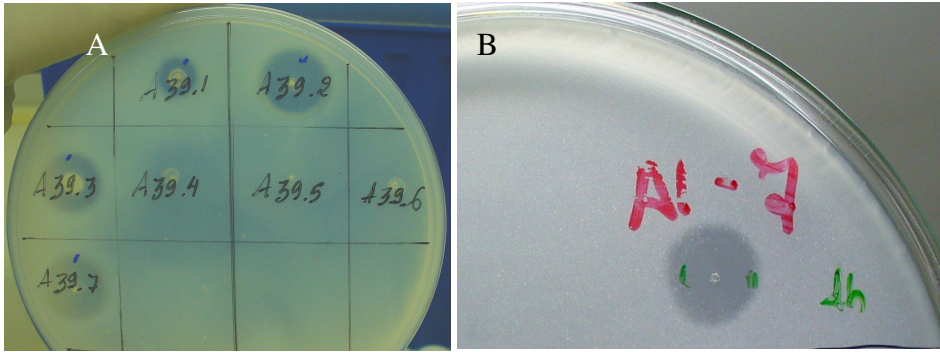


Figura 6: Meio de cultura 1, Agarose tributirina. Setas indicam o halo translúcido ao redor da cultura. Note as diferentes proporções da intensidade e do tamanho do halo/tamanho da cultura, na figura 6A. Na figura 6B é possível visualizar que mesmo não tendo ocorrido crescimento visível, era possível observar a atividade lipolítica.

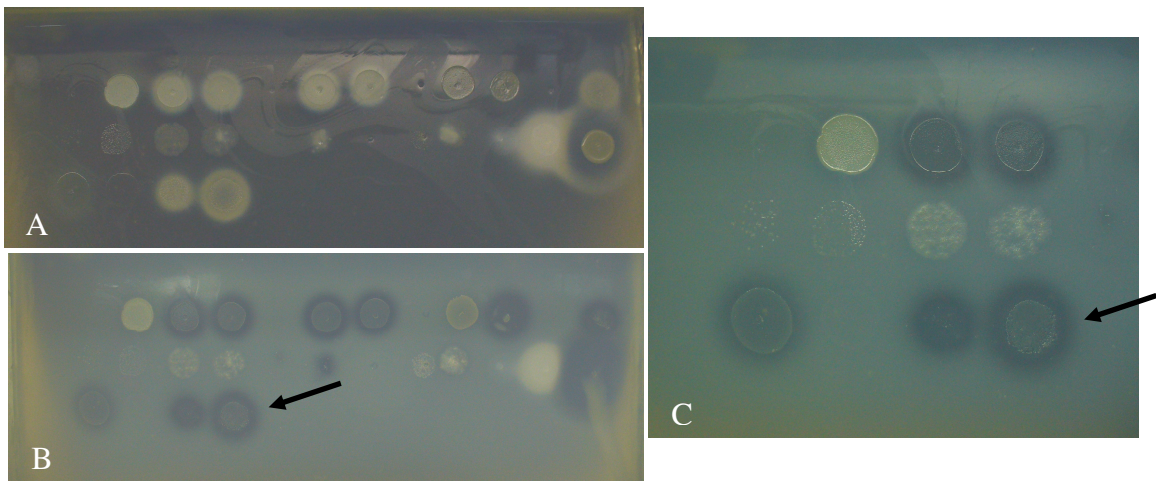


Figura 7: Meio de cultura 2, Agarose Caseína. A- antes da revelação; B- após revelação com ácido clorídrico 1 N; C- detalhe do halo translúcido formado ao redor da cultura e a visualização da caseína precipitada. Setas indicam o halo translúcido ao redor da cultura evidenciando presença de atividade proteásica.

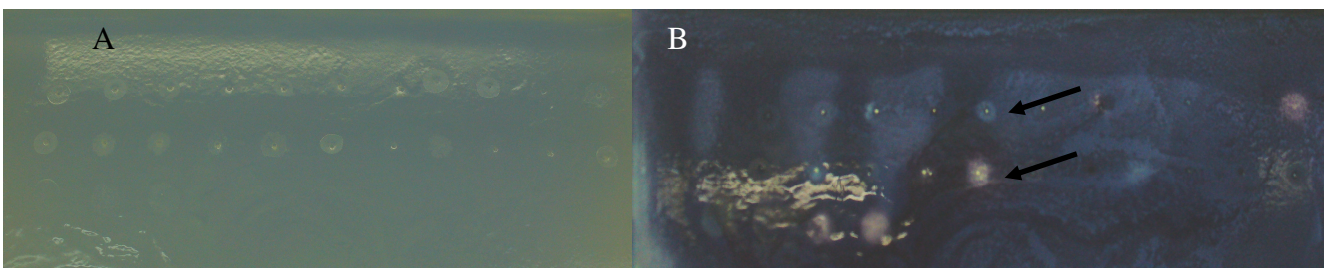


Figura 8: Meio de cultura 3, Agarose Amido de milho, A- antes da revelação; B após revelação com solução de iodo a 2%. Setas indicam o halo translúcido ao redor da cultura evidenciando presença de atividade amilásica.



Figura 9: Meio de cultura 4, Agarose carboximetilcelulose após revelação com vermelho congo e em seguida, solução descolorante. Setas indicam o halo translúcido ao redor da cultura evidenciando atividade celulásica.

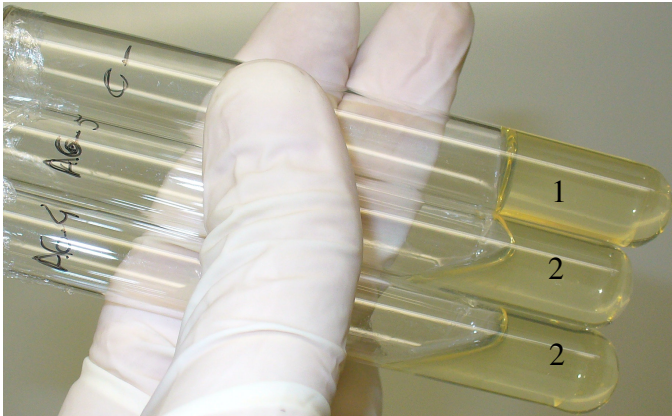


Figura 10: Meio de cultura 5, meio de gelatina, 1- controle negativo; 2- culturas positivas que liquefizeram o meio por proteólise do colágeno presente na gelatina.

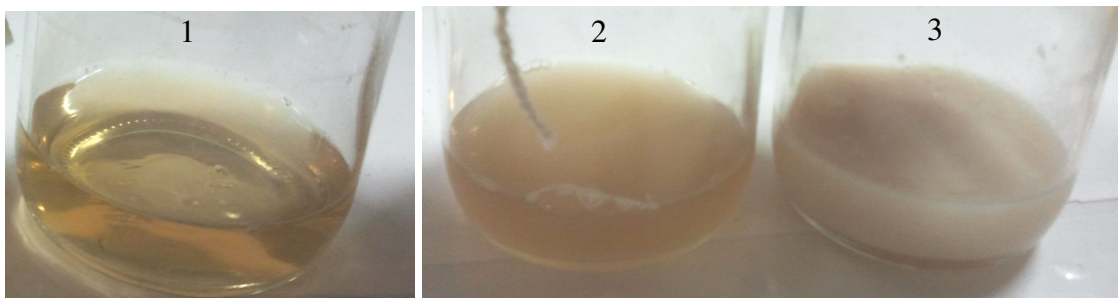


Figura 11: Meio de cultura LB com 2% de óleo de soja em estado bruto (1); com crescimento microbiano (2); e (3) com crescimento microbiano e emulsificação. Note o aspecto leitoso adquirido pelo meio de cultura.

4.3. Caracterização da lipase extracelular

4.3.1. Produção de extrato enzimático extracelular

Para realizar a produção de extrato enzimático extracelular, o primeiro passo era fazer um pré-inóculo, reativando o crescimento e o metabolismo do isolado que estava armazenado em ultrafreezer a -80°C . Para isso, uma alçada do estoque era inoculada em meio LB líquido e incubada a 25°C , por 24 horas sob agitação de 30 hz. Após esse período, 500 μl deste crescimento eram, então, semeados sobre uma membrana de diálise de 12.000 Da, estéril, do mesmo tamanho de uma placa de petri, a qual estava acomodada sobre uma camada de meio de cultura Agar Spirit Blue, suplementado com 3% v/v de emulsão de tributirina (**Figura 12ab**) (Christen & Marshall, 1984). As placas de Petri eram incubadas a 25°C , com a tampa voltada para cima, por um período que variava de 24 horas até 7 dias. Paralelamente era feito um acompanhamento da expressão da lipase, em uma placa de Petri contendo Agar Spirit Blue e um pequeno inóculo desta mesma cultura. Quando era visível a formação de um halo transparente em torno da colônia de acompanhamento, presumia-se que a cultura sobre membrana de diálise também já estava produzindo lipase extracelular e era a hora de realizar a lavagem desta membrana. Por vezes, a indução desta expressão requeria uma dose extra de tributirina, a qual era adicionada sobre a membrana. Alguns isolados também necessitavam indução a frio. Para isso, a placa de Petri contendo a membrana e sua placa irmã com a colônia de acompanhamento, eram ambas mantidas a 4°C por até 48 horas. O monitoramento da colônia de acompanhamento direcionava o momento exato em que deveria ser realizada a lavagem da membrana de diálise.

A lavagem das membranas era realizada com 2 ml de tampão (10 mM Tris-HCl pH 8,4; 40 mM NaCl) e o auxílio de uma alça de Drigalsky (**Figura 12cd**). A partir da realização da lavagem, todo processo era realizado a 4°C , no intuito de auxiliar na manutenção da integridade da atividade enzimática. A suspensão celular era então, centrifugada a $25.000 \times g$, por 20 min a 4°C (**Figura 12ef**), e o sobrenadante era submetido à filtração por filtro $0,22 \mu\text{m}$. 4 μl do extrato enzimático filtrado era aplicado sobre o meio de agarose-tributirina (descrito no item 4.2 - incubação por 24 horas a 25°C) para verificar a integridade da atividade lipásica e o restante era congelado em pequenas alíquotas de 1 ml a -80°C .

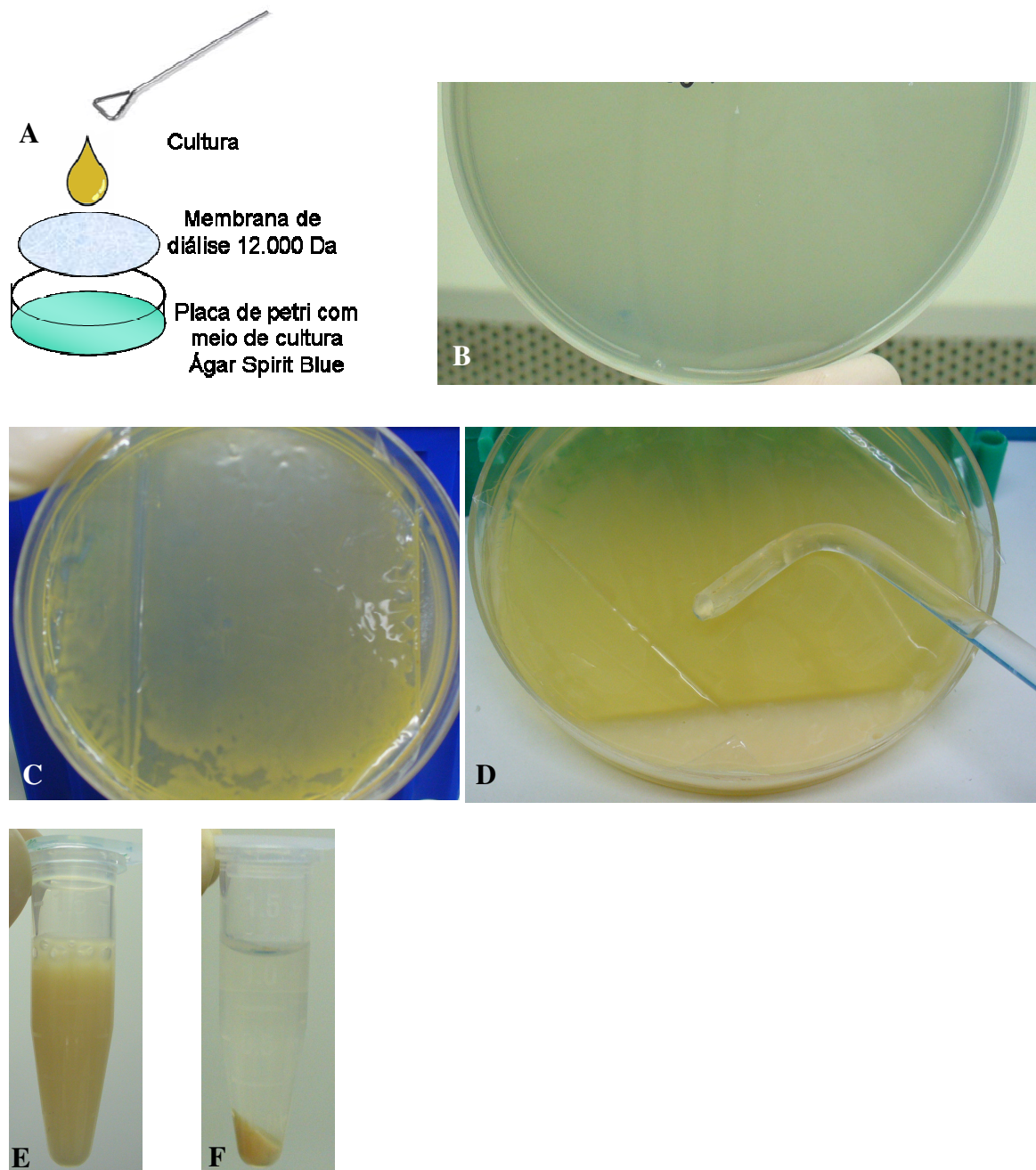


Figura 12: Etapas de produção de extrato de lipase extracelular. A) Esquema de montagem da placa para expressão de lipase; B) Aspecto do meio de cultura Agar Spirit Blue com 0,6% v/v de tributirina, sem membrana e sem inóculo; C) Aspecto do meio Agar Spirit Blue coberto por membrana de diálise, com crescimento microbiano e expressão enzimática; D) Lavagem da membrana de diálise com tampão; E) Aspecto do extrato enzimático bruto coletado da placa de expressão; F) Aspecto do extrato enzimático logo após centrifugação e previamente a filtração.

4.3.2. Determinação de ponto ótimo de atividade: pH e temperatura

O pH ótimo de ação das lipases foi avaliado, utilizando 2 ml de solução de tributirina a 0,3%, preparada no momento de uso (Tris-HCl 50 mM – pHs 4.3, 6.8, 9.8 ou 12.3; CaCl₂ 1 mM; 1,5% v/v emulsão de tributirina) e 75 µl de extrato enzimático estéril, em cubetas de 1cm. A temperatura ótima foi avaliada utilizando 2 ml dessa mesma solução, naquele pH em que a atividade foi máxima, acrescido de 75 µl do extrato enzimático estéril. As temperaturas avaliadas foram 4 °C, 25 °C, 37 °C e 50 °C. A hidrólise da tributirina foi monitorada, em ambos os casos, pela redução na DO_{800nm} em um espectrofotômetro Shimadzu double beam spectrophotometer (UV-ISO-02), utilizando um controle negativo como padrão, nos tempos 0, 4 e 21 horas.

4.3.3. Quantificação da atividade lipásica em ésteres de p-nitrofenol

Foram utilizados 3 diferentes ésteres de p-nitrofenol: butirato (C4), decanoato (C10) e palmitato (C16) (**Figura 13**). Quando este substrato é hidrolisado por uma lipase/esterase, uma molécula de p-nitrofenol (p-NP) é liberada. Neste estado livre, esta molécula apresenta cor amarela, e a medição do aumento da densidade ótica a 405 nm, permite a quantificação em unidades enzimáticas de lipase. Utilizou-se para este ensaio a metodologia descrita por (Fakhreddine *et al.*, 1998), com modificações.

Duas soluções estoque, A e B foram previamente preparadas e armazenadas em geladeira. Solução A: éster de p-NP em 2-propanol. Para o butirato e o decanoato foi utilizada a concentração de 16,5 mM e para o palmitato foi utilizada a concentração de 10 mM. Solução B: Tris-HCl pH 8,0, 50 mM; Triton X-100 0,4% v/v; goma arábica 0,1% p/v; CaCl₂ 10 mM. No momento exato de realização do experimento, era misturado nove partes de B com uma parte de A e 240 µl desta mistura era utilizada em cada um dos 96 poços de uma placa, juntamente com 10 µl do extrato enzimático estéril. Ao controle negativo era adicionado 10 µl do mesmo tampão de diluição da enzima. A placa era então incubada a 25 °C por 15 minutos e a leitura era realizada em um leitor de microplaca Thermo Plate-microplate reader (TP-reader) a 405 nm. Uma unidade enzimática (U) era então definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de p-NP por minuto, nas condições experimentais descritas. Este cálculo era feito utilizando-se a fórmula abaixo, que fornecia a concentração de p-NP liberada no sistema em µmol. A concentração molar encontrada era então dividida pelo tempo de

incubação em presença da lipase testada, expresso em minutos, e assim se obtinha o valor final de quantificação da lipase em unidades enzimáticas (U).

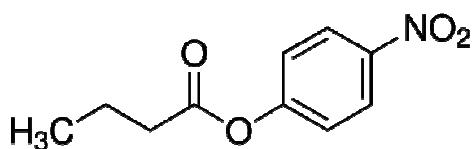
$$A = e.c.l$$

Na qual, A = Valor de absorvância obtido por espectrofotometria a 405 nm.

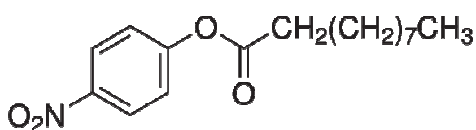
e = coeficiente de extinção molar expresso na unidade cm/mol (é uma constante específica para cada substância química)

c = concentração procurada de p-NP liberado no sistema expressa em μmol

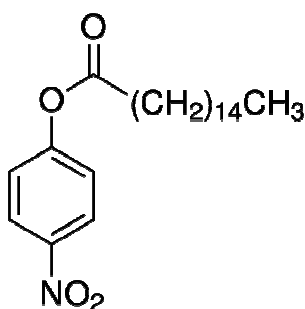
l = espessura da coluna de líquido no interior da cubeta, atravessada pelo feixe de luz, expresso em cm (quando a medição é realizada em cubeta para espectrofotometria, essa medida corresponde a 1 cm).



A) p-nitrofenol butirato (Sigma Aldrich 2012a)



B) p-nitrofenol decanoato (Sigma Aldrich 2012b)



C) p-nitrofenol palmitato (Sigma Aldrich 2012c)

Figura 13: Fórmula química dos ésteres de p-nitrofenol utilizados no experimento de quantificação enzimática. A) p-nitrofenol butirato; B) p-nitrofenol decanoato; C) p-nitrofenol palmitato.

4.3.4. Teste de resistência térmica e de atividade enzimática em presença de agentes químicos

Para melhor caracterização dos extratos enzimáticos, foi avaliada a resistência térmica e química utilizando o butirato de p-nitrofenol como substrato. Para a avaliação da resistência térmica, os extratos enzimáticos foram incubados por 30 minutos a 50 °C e a atividade residual foi quantificada segundo a mesma metodologia descrita no item 4.3.3. Para a avaliação da resistência química, as soluções A e B foram preparadas como descrito no item 4.3.3 e à solução B, foi adicionado, individualmente, uma das seguintes soluções: 0,25% v/v H₂O₂; 0,1% v/v NaClO; 0,1% v/v detergente líquido ou 10 mM EDTA. O ensaio seguiu o mesmo protocolo descrito no item 4.3.3, tendo sido quantificada a atividade hidrolítica em presença destes compostos.

4.4. Identificação dos microrganismos

A identificação dos isolados obtidos neste estudo foi realizada por sequenciamento do gene do RNA ribossomal 16S, em caso de procariotos; e região D1-D2 do gene do RNA ribossomal 26S, em caso de eucariotos.

4.4.1. Extração de DNA

O DNA total de cada isolado foi obtido de uma alçada de cultura de 24 horas em meio LB ágar. As células foram ressuspensas em 250 µl de solução I (50 mM Glicose, 25 mM Tris-HCl pH8, 10 mM EDTA). Foi realizada, então, a lise celular adicionando 25 µl de solução II (200 mM NaOH, 1% p/v SDS) e agitando moderadamente o tubo por 5 minutos até ocorrer a lise total. Adicionou-se então mais 500 µl de solução I para aumentar a diluição do lisado e 2.5 µl of RNase A (10 mg/ml) para promover a degradação do RNA. Essa metodologia foi adaptada do protocolo de lise alcalina, descrito pela primeira vez por (Birnboim & Doly 1979). Os tubos foram incubados por 2 horas a 37 °C. O DNA total foi então purificado por fenol-clorofórmio da seguinte forma: foi adicionado 1 volume de fenol, agitado por 15 segundos, adicionado 1 volume de clorofórmio, agitado por mais 15 segundos e centrifugado a 20.000 x g por 10 minutos. A fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo, ao qual foi adicionado mais 1 volume de clorofórmio, e novamente, agitado por 15 segundos e centrifugado a 20.000 x g por 10 minutos. A fase aquosa foi coletada novamente em novo tubo ao qual foi adicionado 2 volumes de solução de precipitação (5% de acetato

de sódio 3M em etanol P.A.). O tubo foi incubado no gelo por 30 minutos e centrifugado a 20.000 x g por 15 minutos. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70%, novamente centrifugado a 20.000 x g por 10 minutos e mantido a 37 °C até a completa evaporação do etanol. O DNA foi então armazenado precipitado, para evitar a degradação. Para realização da PCR, o DNA foi ressuspendido em 30 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA).

4.4.2. Amplificação e sequenciamento do gene de RNA ribossomal

O DNA bacteriano obtido no item 4.4.1 foi amplificado por PCR de acordo com metodologia descrita por (Pontes *et al.*, 2009), utilizando os iniciadores 8F (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3' - (Felske *et al.*, 1997) e 907R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3' - (Lane, 1991) pra o gene rRNA 16S. Já o DNA eucariótico, foi amplificado por PCR de acordo com metodologia descrita por (Lachance *et al.*, 1999), utilizando os iniciadores NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') para o domínio D1/D2 do gene rRNA 26s (**Figura 14**). Foi utilizado 1 µl de DNA, 12,5 µl de pré-mix IC (Phoneutria - Brasil), 9,5 µl de água ultrapura para biologia molecular (Phoneutria - Brasil), e 1 µl de iniciadores na concentração de (5 pmol/µl). A amplificação do DNA bacteriano utilizou um programa “touch down”, com 5 minutos de desnaturação inicial a 94 °C, seguida por repetições do seguinte ciclo: um minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento e 3 minutos de extensão a 72 °C. A temperatura de anelamento abaixava em 1 grau a cada 2 ciclos, iniciando em 53 °C e finalizando em 45°C, quando o ciclo se repetia por 12 vezes. Por fim, 15 minutos de extensão final a 72 °C.

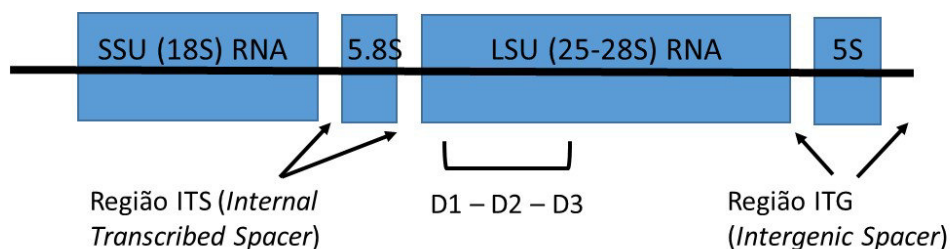


Figura 14: Representação esquemática do gene do RNA ribossômico eucariótico, evidenciando o fragmento D1/D2 amplificado por PCR para sequenciamento e identificação molecular

Os amplicons foram visualizados em gel de agarose 1,5 %, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e seqüenciados em seqüenciador automático (Applied Biosystems Automated DNA sequencer 3130) pelo método dideoxy-terminator utilizando o kit comercial *BigDye Terminator Cycle Sequencing* vs. 3.1 (Applied Biosystems, Califórnia/USA) e um dos iniciadores da reação de PCR, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

As seqüências foram submetidas à análise de qualidade, alinhadas e analisadas com o programa *CodonCode Aligner v.3.7.1* (CodonCode Corporation, Centerville, MA, USA) e depositadas no *GenBank* (números de acesso KC310807 a KC310842). As seqüências foram, então, comparadas em banco de dados *GenBank* usando o programa *BLASTn* (NCBI/Genbank, 2012), e no banco de dados *Ribosomal Database Project* (Ribosomal Database Project/RDP, 2013), utilizando os programas *Sequence match* e *Classifier* para identificação do microrganismo. Seqüências que apresentaram pouca similaridade nos bancos utilizados foram analisadas no programa *Bellerophon* (Huber *et al.*, 2004), para excluir qualquer possibilidade de seqüência quimera. Sequências quimeras são aquelas em que ocorre uma mistura de sequências de dois ou mais microrganismos. São muito comuns em bibliotecas metagenômicas. Apesar de esta não ter sido a técnica utilizada para o isolamento do material genético, a análise no programa *Bellerophon* foi realizada para excluir a possibilidade de quimeras, dado que a algumas sequências apresentaram baixa similaridade genética com sequências de outros microrganismos, o que é um indicativo de espécie nova ou espécie cujo gene rRNA ainda não foi descrito.

4.5. Indução da produção de lipase e efeito do sinergismo entre diferentes linhagens lipolíticas

Este experimento foi realizado com dois objetivos. Primeiro, avaliar o comportamento do metabolismo microbiano mediante a incubação do pré-inóculo com tributirina, para indução da produção de lipase. E segundo, avaliar o comportamento do metabolismo microbiano quando o óleo (mistura complexa de triglicerídeos), a ser hidrolisado era apresentado em sua forma emulsificada. Esse segundo objetivo seria sugestivo de um possível sinergismo entre as diferentes espécies lipolíticas, dado que a emulsão lipídica foi obtida por biossurfactantes produzidos por um de nossos isolados do banco microbiológico.

Dessa forma, o pré-inóculo de cinco isolados diferentes (com diferentes perfis de hidrólise e emulsificação), foi cultivados com e sem indução lipolítica pela presença de 0,6% v/v de tributirina no meio de cultura LB caldo, o que atenderia o primeiro objetivo de avaliar o comportamento da expressão de lipase microbiana mediante indução. Volumes de 2,5; 5; 10; 20; e 40 µl destes pré-inóculos padronizados com uma $DO_{600} = 0,5$, foram utilizados, individualmente, para calibrar qual seria a melhor concentração e o melhor tempo de incubação em presença de alamar blue, e determinar a curva padrão. Feito isso, esta concentração ótima foi inoculada em 100 µl de meio LB caldo em cada um dos 96 poços de uma placa de microtitulação e a eles foi adicionado 10 µl de alamar blue (10% v/v). Em triplicata, cada um dos dois tipos de pré-inóculo (induzido e não induzido) foram submetidos aos seguintes tratamentos: 1) sem suplementação. 2) suplementado com 2% de tributirina líquida. 3) suplementado com 2% de óleo de soja. 4) suplementado com 2% de emulsão lipídica, obtida a partir de óleo bruto incubado com extrato bacteriano estéril (este quarto grupo atenderia ao segundo objetivo de avaliar a ação sinérgica de duas linhagens microbianas). O monitoramento do percentual de redução do alamar blue, em DO_{570} e DO_{600} nm, indicou, então, em qual situação a cultura de cada um desses isolados apresentou o metabolismo mais elevado. O cálculo do desvio padrão indicou o quanto os valores obtidos se distanciaram da média. Foi realizada a análise de variância, aplicando o teste ANOVA de duas variáveis, com correção de Bonferroni pós-teste no programa GraphPad Prism version 5.03 for Windows (GraphPad Software, 2009).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nosso banco de microrganismos lipolíticos foi selecionado pela presença de um halo claro ao redor dos diferentes morfotipos que foram obtidos quando amostras ambientais foram inoculadas por espalhamento na superfície do Ágar Spirit Blue, suplementado com 3% v/v de emulsão de tributirina. Dentre os morfotipos de nosso banco de microrganismos, optamos por trabalhar com esses 35, uma vez que eles foram isolados de amostras de esgoto, o que, já poderia dar um direcionamento para o tipo de atividade enzimática que estávamos procurando.

A tributirina, triglicerídeo utilizado para triagem inicial da atividade lipolítica, é formada por 1 molécula de glicerol ligada a 3 cadeias éster de apenas 4 carbonos. Assim, as esterases, enzimas que hidrolisam ésteres, foram selecionadas preferencialmente às lipases. Optamos por realizar a triagem inicial dessa forma, para evitarmos desconsiderar algum morfotipo por este não ser capaz de hidrolisar cadeias éster mais longas ou complexas. Porém, como toda lipase também pode ser classificada como uma esterase, dentre estes microrganismos selecionados, diversos também demonstraram atividade lipolítica. No esgoto, estão presentes ésteres com cadeias de comprimentos e complexidades variados, e a ideia era conseguir hidrolisar essas cadeias até se obter moléculas cujo efeito poluente sobre o meio ambiente fosse o menor possível. O que seria alcançado, reduzindo essas cadeias à seus produtos mais simples.

A análise da seqüência de DNA ribossomal 16s (para procariotos) ou 28s (para eucariotos) e sua comparação com os bancos de dados *GenBank* e *RDP*, forneceu a identificação molecular dos isolados a nível de família, gênero ou espécie. A **tabela 1** a seguir apresenta os isolados com suas respectivas identificação, local de coleta, capacidade de produção de biossurfactantes e perfil de produção de enzimas hidrolíticas: esterases; proteases; amilases; e celulases. Pode-se perceber que os sítios de coleta A e B apresentaram predominância de membros da família *Bacillaceae*. Enquanto nos sítios C e D, pode-se verificar a presença tanto de membros da família *Enterobacteriaceae*, quanto de indivíduos dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*. Havendo no sítio D, prevalência de *Pseudomonas* spp. A sequência do gene rRNA do isolado eucarioto A2 apresentou baixa similaridade com outros microrganismos eucariotos, sendo mais similar a *Galactomyces geotrichum* e *Badhamia utricularis*. Este isolado foi eficiente em hidrolisar esterres de 4, 10 e 16 carbonos, com maior eficiência sobre cadeias de 20 carbonos. Sua atividade foi persistente em amplo espectro de

temperaturas, porém, apenas em pH alcalino (**tabela 2**). Sua atividade lipolítica também foi resistente ao tratamento térmico e aos agentes químicos testados (**tabela 3**), apresentando atividade residual superior a 50% em todas as situações.

Lipases bacterianas extracelulares apresentam grande importância comercial, uma vez que milhares de unidades enzimáticas podem ser produzidos com apenas alguns litros de meio de cultura (Gupta *et al.*, 2004). As lipases de origem bacteriana são, em sua maioria, extracelulares e sofrem grande influência de fatores nutricionais e físico-químicos, tais como temperatura, pH, fontes de nitrogênio e carbono utilizadas no meio de cultura, presença de lipídeos, sais inorgânicos, agitação e concentração de oxigênio dissolvido (Gupta *et al.*, 2004). As lipases são na sua maioria enzimas indutíveis sendo, portanto, geralmente produzidas na presença de uma fonte de lipídeo, ou qualquer outro indutor, tal como triacilgliceróis, ácidos graxos, ésteres hidrolisáveis tweens, sais biliares e glicerol (Gupta *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2001; Rathi *et al.*, 2001). Entretanto, a sua produção é significativamente afetada por outras fontes de carbono, tais como açúcares, álcoois, polissacarídeos, soro de leite, casaminoácidos e outras fontes complexas (Rashid *et al.*, 2001; Ghanem *et al.*, 2000).

Tabela 1: Locais de coleta, identificação dos isolados, números de acesso às seqüências depositadas no GenBank e perfil enzimático dos isolados.

Local de coleta	n°	Identificação no Ribossomal Data Project (Ribossomal Database Project/RDP 2013)	Lipase	Gelatinase	Caseinase	Amilase	CM Cellulase	Tempo necessário para emulsificar 2% (v/v) óleo de soja *
Caixa de gordura / São Sebastião das Águas Claras/MG	A1	<i>Terribacillus</i> sp. (GenBank KC310807)	++	-	-	-	-	Não emulsifica
	A2	Unclassified Saccharomycetales (GenBank KC310808)	++	-	++	-	-	Emulsificação parcial
	A3	<i>Bacillus pumilus</i> (GenBank KC310809)	++	-	++	-	++	5 dias
	A4	<i>Bacillus pumilus</i> (GenBank KC310810)	+	-	++	-	++	10 dias
	A5	<i>Terribacillus</i> sp. (GenBank KC310811)	++	-	-	-	-	7 dias
	A6	<i>Bacillus pumilus</i> (GenBank KC310812)	++	-	++	-	++	7 dias
	A7	<i>Bacillus pumilus</i> (GenBank KC310813)	+	-	++	-	++	7 dias
	A8	<i>Bacillus</i> sp. (<i>B. megaterium</i> / <i>B. flexus</i>) (GenBank KC310814)	+	++	-	-	-	Não emulsifica
	A9	<i>Staphylococcus</i> spp. (<i>S. sciuri</i> / <i>S. xylosus</i>) (GenBank KC310815)	++	++	++	-	-	Não emulsifica
	A10	família Flavobacteriaceae - (<i>Empedobacter brevis</i> ou <i>Wautersiella flasenii</i>) (GenBank KC310816)	+++	++	++	-	-	Emulsificação parcial
Efluente de indústria de laticínios / Crucifândia/MG	B1	<i>Bacillus megaterium</i> (GenBank KC310817)	+	++	-	-	-	Emulsificação parcial
	B2	<i>Bacillus</i> spp. (<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> / <i>B. amyloliquefaciens</i>) (GenBank KC310818)	++	+++	++	++	++	Não emulsifica
	B3	<i>Lysinibacillus</i> spp. (<i>L. sphaericus</i> / <i>L. fusiformis</i>) (GenBank KC310819)	++	-	-	-	-	7 dias
	B4	<i>Lysinibacillus</i> spp. (<i>L. sphaericus</i> / <i>L. fusiformis</i>) (GenBank KC310820)	++	-	-	-	-	10 dias
	B5	<i>Lysinibacillus</i> spp. (<i>L. sphaericus</i> / <i>L. fusiformis</i>) (GenBank KC310821)	++	-	-	-	++	7 dias
	B6	<i>Bacillus cereus</i> (GenBank KC310822)	++	-	-	-	++	Não emulsifica
	B7	<i>Bacillus subtilis</i> (GenBank KC310823)	+	++	-	++	++	Não emulsifica
	B8	<i>Bacillus subtilis</i> (GenBank KC310824)	+	++	++	++	++	Não emulsifica
	B9	<i>Bacillus</i> spp. (<i>B. simplex</i> / <i>B. macroides</i> / <i>B. frigotolerans</i>) (GenBank KC310825)	+	++	-	-	-	Emulsificação Parcial
		Associação mutualística <i>Bacillus</i> sp. (GenBank KC310826) + <i>Staphylococcus epidermidis</i> (GenBank KC310827)	+	-	-	-	-	7 dias
	B10	<i>Bacillus cereus</i> (GenBank KC310828)	++	-	++	-	++	Não emulsifica
	B11	<i>Acetobacter pasteurianus</i> (GenBank KC310829)	+	-	-	-	-	3 dias
	B12	<i>Acetobacter pasteurianus</i> (GenBank KC310830)	+	-	-	-	-	7 dias
Caixa de gordura / Crucifândia/ MG	C1	família Enterobacteriaceae (<i>Serratia</i> sp.; <i>Yersinia</i> sp.) (GenBank KC310831)	++	+++	+++	-	-	14 dias
	C2	<i>Pseudomonas</i> spp. (<i>P. corrugata</i> / <i>P. fluorescens</i> / <i>Marinobacter arcticus</i>) (GenBank KC310832)	++	++	++	-	-	7 dias
		família Enterobacteriaceae (<i>Enterobacter aerogenes</i> / <i>Leclercia adecarboxylata</i> / <i>Pantoea agglomerans</i>) (GenBank KC310833)	+	-	-	-	-	7 dias
	C3	<i>Bacillus</i> spp. (<i>B. subtilis</i> / <i>B. amyloliquefaciens</i>) (GenBank KC310834)	+	+++	++	++	++	7 dias
	C4	<i>Bacillus subtilis</i> (GenBank KC310835)	+	+++	++	++	+++	7 dias
Efluente de indústria de biotecnologia/ Belo Horizonte/ MG	D1	<i>Bacillus megaterium</i> (GenBank KC310836)	++	++	+++	++	-	Não emulsifica
	D2	<i>Pseudomonas</i> spp. (<i>P. rhodesiae</i> / <i>P. putida</i> / <i>P. fluorescens</i>) (GenBank KC310837)	+++	+++	+++	-	-	14 dias
	D3	<i>Pseudomonas</i> spp. (<i>P. taetrolens</i> / <i>P. putida</i> / <i>P. umsongensis</i> / <i>P. fluorescens</i>) (GenBank KC310838)	+++	+++	+++	-	-	Emulsificação Parcial
	D4	família Enterobacteriaceae (<i>Serratia fonticola</i> / <i>Rahnella</i> sp.) (GenBank KC310839)	+	-	-	-	-	10 dias
	D5	<i>Pseudomonas</i> spp. (<i>P. rhodesiae</i> / <i>P. fluorescens</i> / <i>P. putida</i>) (GenBank KC310840)	++	-	-	-	-	7 dias
	D6	família Enterobacteriaceae (<i>Serratia fonticola</i> / <i>Rahnella</i> sp.) (GenBank KC310841)	+	-	-	-	-	Emulsificação Parcial
	D7	<i>Pseudomonas</i> spp. (<i>P. rhodesiae</i> ; <i>P. putida</i>) (GenBank KC310842)	+++	+++	+++	-	-	Emulsificação Parcial

(-) sem atividade enzimática; (+) baixa atividade enzimática (tamanho da colônia/tamanho do halo < 2); (++) atividade enzimática mediana (tamanho da colônia/tamanho do halo 2 ≤ x < 5); (+++) atividade enzimática forte (tamanho da colônia/tamanho do halo ≥ 5); (*) tempo máximo de experimento foi 36 dias.

Sendo assim, 10 ml de extrato enzimático extracelular foram produzidos para a caracterização da lipase de cada um dos 35 isolados. Apesar da indução com tributirina, realizada neste passo, a atividade de lipase de dois isolados (A9 – *Staphylococcus* spp.- e B9 – *Bacillus* spp.), não pode ser recuperada, veja a **tabela 2**. No ecossistema da caixa de gordura, a coexistência com outras linhagens microbianas poderia estar suprindo algumas necessidades nutricionais devido à degradação parcial de algum outro biopolímero naturalmente presente nas águas residuais. Além disso, a competição por nutrientes e interação com outras espécies microbianas também poderiam estar levando à indução da expressão de lipase, de modo que ela permaneceu ativa durante as primeiras subculturas. Cada linhagem exigia um tempo e/ou temperatura de cultivo diferente para expressar a lipase extracelular (**tabela 2**). Sendo assim, o tempo exato de incubação necessário para expressão extracelular de lipase sobre a membrana de diálise era sempre monitorado por incubação, em paralelo, de uma cultura-irmã diretamente em ágar Spirit Blue, suplementado com tributirina. Quando era observada a formação de halo ao redor das colônias, isso significava que estava ocorrendo a produção de lipase e que estava no momento correto de realizar a lavagem da membrana de diálise. É necessário ressaltar que as condições ótimas de crescimento e expressão de lipase não foram determinadas para cada uma das linhagens separadamente.

Após confirmação da presença de atividade lipolítica nos extratos, o pH e temperatura ótimos de atividade foram avaliados (**tabela 2**) Dentre os extratos, é possível perceber uma predominância de enzimas mesofílicas, com pH ótimo na faixa alcalina, mas também foram observadas enzimas psicrófilas e acidófilas. Em geral, lipases bacterianas possuem atividade ótima em pH alcalino a neutro (Kanwar & Goswami, 2002; Sunna *et al.*, 2002; Dharmstithi & Luchai, 1999; Lee *et al.*, 1999). Lipases produzidas por espécies do gênero *Bacillus*, geralmente apresentam atividade em uma ampla faixa de pH (pH 3-12) (Bradoo *et al.*, 1999), nossos resultados indicaram que os extratos produzidos por estas espécies frequentemente apresentaram mais de um pH ótimo. No entanto, em contraste com os resultados apresentados por estes autores, nossas lipases produzidas por espécies deste gênero apresentaram queda de atividade em temperaturas mais elevadas, sendo o ponto ótimo observado em temperaturas mesofílicas. Apenas as lipases secretadas por isolados de *B. cereus* foram mais termotolerantes, alcançando o ponto ótimo de atividade a 50 °C. Alguns de nossos isolados exibiram estabilidade térmica a 50 °C e retiveram mais de 70% de atividade, mesmo após tratamento por 30 minutos, foram elas: A5 (*Terribacillus* sp.), A10 (family *Flavobacteriaceae*), B3, B4 e

B5 (*Lysinibacillus* spp.), B7, B8, e C5 (*Bacillus subtilis*), B10 (Associação mutualística de *Bacillus cereus* e *Staphylococcus* spp.), B11 (*Bacillus cereus*), C2, D2, D3, D5 e D7 (*Pseudomonas* spp.), e D1 (*Bacillus megaterium*) (**tabela 3**). A resistência térmica de lipases produzidas por espécies de *Bacillus* e *Pseudomonas* já foram descritas anteriormente (Zhang & Zeng, 2008; Bora & Kalita, 2007; Hassan *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2005).

Lipases bacterianas, geralmente, apresentam atividade ótima na faixa de temperatura compreendida entre 30-60 °C; entretanto, alguns trabalhos já demonstraram que existem lipases de origem bacteriana que apresentam atividade ótima tanto acima, quanto abaixo, desses extremos (Sunna *et al.*, 2002; Litthauer *et al.*, 2002; Dharmsthiti & Luchai, 1999; Lee *et al.*, 1999). A quantificação das lipases em unidades enzimáticas, utilizando como substrato pNP-butirato (C4), decanoato (C10), and palmitato (C16) foi realizada em uma condição fixa para todas as enzimas, a 25 °C e pH 8.0 (**Tabela 2**). A maioria dos extratos foi ativa em ésteres de cadeia curta (butirato), o que era esperado, dado que a seleção dos isolados foi realizada com tributirina, que consiste numa molécula de glicerol ligada a 3 cadeias éster de 4 carbonos (butirato). Adicionalmente, estes resultados foram consistentes com o fato de que todas as lipases também podem ser consideradas esterases, e apresentam atividade esterolítica. No entanto, os isolados A2, A10, B4, B5, B6, C1, C2, D2, D3, D4, D5, D6, e D7 apresentaram maior afinidade com ésteres de cadeia longa, caracterizando assim estes extratos como lipases verdadeiras, dado que as lipases verdadeiras são aquelas que hidrolisam ésteres com mais de 10 átomos de carbono (**tabela 2**).

Tabela 2: Local de coleta, tempo de incubação sobre membrana de diálise para expressão lipásica, pH e temperatura ótimos de atividade lipásica e quantificação enzimática com p-NPB (C4), p-NPD (C10), and p-NPP (C16) – valores expressos em unidades de lipase.

Local de coleta	nº	Tempo de incubação sobre membrana de diálise	pH*	Temperatura* (°C)	Em unidades enzimáticas**			
					p-NPB C4	p-NPD C10	p-NPP C16	
Caixa de gordura / São Sebastião das Águas Claras/MG	A1	6 dias	12,3	25	0,96	1,01	0,96	
	A2	24 horas	12,3	5 a 25 (25)***	2,21	5,45	1,09	
	A3	24 horas	6,8 a 9,8 (9,8)***	25 a 37 (25)	5,30	2,08	0,82	
	A4	24 horas	6,8 a 12,3 (9,8)	25	0,13	0,12	0,02	
	A5	4 dias a 25°C +1 dia a 4°C	6,8 a 9,8 (9,8)	5 a 37 (5)	2,50	0,95	0,20	
	A6	24 horas	6,8 a 12,3 (9,8)	25	2,40	1,01	0,44	
	A7	24 horas	6,8 a 9,8 (9,8)	25	0,00	0,41	0,00	
	A8	24 horas	9,8	5 e 37	15,34	0,92	0,08	
	A9	A atividade não pôde ser recuperada						
	A10	6 dias	9,8 a 12,3 (12,3)	50	9,97	9,18	0,49	
Efluente de indústria de laticínios / Crucilândia/MG	B1	24 horas	12,3	5 a 25	8,74	0,21	0,29	
	B2	48 horas	9,8 a 12,3 (12,3)	5 a 25 (5)	5,17	0,23	0,19	
	B3	48 horas	12,3	37	0,73	0,46	0,30	
	B4	48 horas	12,3	37 a 50	1,21	1,19	0,39	
	B5	24-48 horas	4,3 a 6,8 e 12,3 (12,3)	50	0,64	1,65	1,01	
	B6	24-48 horas	12,3	37 a 50	0,44	0,92	0,68	
	B7	6 dias	9,8 a 12,3	5 a 25 (5)	3,07	0,19	0,33	
	B8	6 dias	12,3	37 a 50	1,09	0,08	0,05	
	B9	A atividade não pôde ser recuperada						
	B10	24 horas	4,3	5 a 25 (25) e 50	0,24	0,04	0,05	
	B11	24-48 horas	12,3	37 a 50	0,31	0,83	0,52	
	B12	6 dias	9,8 a 12,3 (12,3)	5 a 25 (5)	1,87	0,33	0,02	
	B13	6 dias	9,8 a 12,3 (9,8)	5 a 50 (25 a 37)***	6,15	1,74	0,78	
Caixa de gordura/ Crucilândia/ MG	C1	24 horas	6,8 a 12,3 (6,8 a 9,8)***	5 a 37	6,43	28,06	10,72	
	C2	6 dias	6,8 a 12,3 (9,8)	5 a 37 (25 a 37)	4,11	8,36	2,43	
	C3	6 dias a 25°C +1 dia a 4°C	9,8 a 12,3	5 a 37 (37)	0,48	0,18	0,16	
	C4	48 horas	12,3	37 a 50 (50)	4,41	0,66	0,28	
	C5	48 horas	12,3	37 a 50	5,39	1,11	0,49	
Efluente de indústria de biotecnologia/ Belo Horizonte/ MG	D1	24 horas	9,8 a 12,3	5 e 37	0,30	0,22	0,15	
	D2	24 horas	4,3 a 6,8 (6,8)	5 a 37 (37)	3,77	16,68	11,29	
	D3	24 horas	6,8 a 9,8 (9,8)	25 a 37 (37)	22,83	16,80	1,73	
	D4	6 dias a 25°C +1 dia a 4°C	4,3 e 9,8 a 12,3 (9,8 a 12,3)	5 a 37 (5)	4,93	6,50	1,21	
	D5	24 horas	12,3	37 a 50	1,65	2,28	0,38	
	D6	6 dias	4,3 a 6,8 (6,8)	5 e 37	1,85	10,14	3,10	
	D7	24 horas	4,3 a 9,8 (4,3 a 6,8)	5 a 37 (37)	9,61	28,60	16,59	

(*) Faixa de valores nos quais o extrato lipolítico manteve pelo menos 70% ou mais de atividade.

(**) Uma unidade lipásica (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de p-nitrofenol por minuto, nas condições experimentais.

(***) Números entre parênteses indicam os valores nos quais a enzima apresentou maior atividade – pode eventualmente indicar uma faixa de valores.

Existem 3 categorias de lipases microbianas: não-específicas, regioespecíficas e ácido graxo-específicas (Gupta *et al.*, 2004). As lipases não-específicas agem randomicamente em moléculas de triacilglicerídeos, o que resulta em uma completa liberação dos ácidos graxos e do glicerol (Gupta *et al.*, 2004). Lipases regioespecíficas são aquelas que agem sobre o grupamento 1,3-acil, ou seja, hidrolisam apenas ligações éster primárias. Esta especificidade pode ser observada em algumas espécies de *Bacillus* (Gupta *et al.*, 2004). O terceiro grupo, lipases ácido graxo-específicas, compreende aquelas com pronunciada afinidade por um tipo específico de ácidos graxos, quanto ao tamanho da cadeia e número de insaturações (Gupta *et al.*, 2004). Apesar de ter apresentado atividade em agarose-tributirina, o isolado A7 (*Bacillus pumillus*) não apresentou atividade quando avaliada a hidrólise pNPB e pNPP (4 e 16 carbonos), e exibiu atividade escassa em pNPD (10 carbonos) (**tabela 2**). Este comportamento pode ser explicado pelo fato de algumas lipases apresentarem afinidade por triacilglicerídeos, exibindo pouca, ou nenhuma atividade em mono- e diglicerídeos (Gilham & Lehner, 2005; Xu 2000). Outra explicação possível é de que o isolado A7, originalmente capaz de produzir mais de um tipo de esterase. Porém, ao longo das passagens do subcultivo *in vitro* a linhagem tenha passado a expressar somente aquela enzima com afinidade pelas cadeias éster de 10 átomos de carbono. Este tipo de comportamento pode ser observado em diferentes espécies *in vitro*. Adicionalmente, ainda é possível que nosso sistema não tenha sido suficientemente sensível para detectar a expressão reduzida após diversas passagens em meio de cultura.

Tabela 3: Porcentagem de atividade lipásica residual após diferentes tratamentos

Local de coleta	nº	¹ 0,25% (v/v) H ₂ O ₂	² 0,1% (v/v) NaClO	³ 0,1% (v/v) detergente líquido	⁴ 10 mM EDTA	⁵ Resistência térmica após tratamento por 30 min a 50 °C	
Caixa de gordura / São Sebastião das Águas Claras/MG	A1	101%	56%	0%	5%	36,9%	
	A2	93%	95%	110%	59%	65,0%	
	A3	117%	8%	40%	88%	21,5%	
	A4	96%	0%	17%	78%	42,7%	
	A5	57%	103%	78%	12%	77,4%	
	A6	97%	1%	80%	80%	18,3%	
	A7	82%	17%	28%	87%	45,8%	
	A8	136%	116%	156%	110%	5,4%	
	A9	A atividade não pôde ser recuperada					
	A10	86%	0%	0%	34%	96,9%	
Efluente de indústria de laticínios / Crucilândia/MG	B1	102%	111%	101%	66%	7,3%	
	B2	22%	0%	101%	56%	54,3%	
	B3	14%	11%	11%	0%	81,8%	
	B4	67%	10%	3%	384%	124,1%	
	B5	63%	11%	43%	0%	73,6%	
	B6	64%	109%	88%	28%	56,5%	
	B7	60%	0%	118%	47%	72,9%	
	B8	23%	36%	0%	22%	76,3%	
	B9	A atividade não pôde ser recuperada					
	B10	42%	0%	167%	0%	98,6%	
B11	0%	103%	28%	18%	94,6%		
B12	25%	18%	74%	29%	44,3%		
B13	41%	28%	7%	6%	26,1%		
Caixa de gordura / Crucilândia/ MG	C1	102%	110%	126%	0%	68,1%	
	C2	103%	102%	125%	35%	100,2%	
	C3	131%	52%	89%	0%	61,8%	
	C4	0%	0%	0%	0%	51,5%	
	C5	41%	0%	20%	28%	75,3%	
Efluente de indústria de biotecnologia/ Belo Horizonte/ MG	D1	53%	0%	122%	41%	77,4%	
	D2	95%	45%	70%	0%	71,0%	
	D3	44%	9%	128%	0%	94,5%	
	D4	111%	0%	1008%	2%	49,2%	
	D5	47%	18%	192%	10%	85,1%	
	D6	72%	0%	11%	81%	20,7%	
	D7	70%	0%	54%	0%	75,7%	

Os resultados são apresentados para atividade lipolítica quando o experimento era realizado em presença de ¹0,25% (v/v) H₂O₂, ²0,1% (v/v) NaClO, ³0,1% (v/v) detergente líquido, ⁴10 mM EDTA, ou ⁵após tratamento térmico por 30 minutos a 50°C. A hidrólise do p-NPB (C4) foi utilizada para todas as quantificações. Controles sem tratamento foram utilizados para comparação de resultados.

Algumas similaridades bioquímicas foram observadas entre microrganismos da mesma espécie ou gênero. Isolados de *Lysinibacillus* spp. apresentaram diversas similaridades entre si, tais como secreção de lipases após 48 horas de incubação, pH ótimo alcalino, temperatura ótima de 37°C ou maior e ausência de secreção de gelatinase, caseinase ou amilase. Vinte, dos 35 isolados avaliados neste trabalho pertencem à família **Bacillaceae**, dos quais, 15 pertencem ao gênero *Bacillus*. Todos os isolados identificados como *B. megaterium* eram capazes de secretar gelatinase e incapazes de produzir celulase. Secretavam lipase após 24 h de incubação sobre membrana de diálise, e seus extratos lipolíticos com atividade ótima em pH alcalino e temperatura mesófila a psicrófila, além de serem mais ativos na hidrólise de ésteres de 4 carbonos (p-nitrofenol butirato) quando comparado aos ésteres de p-NP de cadeias longas. Todos os 5 isolados de *B. subtilis*, secretavam amilase, celulase e gelatinase, mas apenas 4 produziram caseinase. Além disto, os extratos lipolíticos de todos os 5 *B. subtilis* apresentaram atividade ótima em pH alcalino e maior afinidade com ésteres de cadeias de 4 carbonos. Já dentre os 5 isolados de *Pseudomonas* spp., todos eram produtores de amilase e celulase, porém apenas 4 também apresentavam capacidade de produzir os dois tipos de proteases testadas. Todos os extratos lipolíticos de *Pseudomonas* apresentaram atividade considerável à 37°C e sobre cadeias éster de 10 carbonos (p-NP decanoato), o que indica a secreção de pelo menos um tipo de lipase verdadeira (**tabelas 1 e 2**).

Para avaliação preliminar do potencial de utilização das lipases no tratamento de esgoto, foi avaliada a resistência térmica e química dos extratos, utilizando o p-NPB como substrato (**tabela 3**). Diversos produtos de limpeza e outras substâncias químicas são comuns nos esgotos, e liberadas diariamente nas caixas de gordura. Nenhum dos extratos lipolíticos manteve mais de 70% de atividade residual ao mesmo tempo, em todas as condições analisadas. O isolado A2 (**Saccharomycetales** sem classificação conhecida) apresentou o melhor resultado quando todas as condições foram analisadas de forma combinada, tendo mantido mais de 50% de atividade em presença de H₂O₂, NaClO, detergente líquido, EDTA e após tratamento térmico durante 30 minutos a 50°C. Outros extratos também apresentaram alguma resistência, incluindo B6 (de *Bacillus cereus*) e B12 (de *Acetobacter pasteurianus*), os quais mantiveram atividade superior a 20% em todas as condições testadas. Além do extrato de A2, uma combinação de extratos poderia atender às necessidades de degradação de uma caixa de gordura, sendo potencialmente vantajosa na composição de um possível produto para

desentupimento ou limpeza, assim como em uma estação de tratamento de esgoto (ETE), para pré-tratamento ou limpeza de equipamentos e tubulações. A forte inibição da atividade lipolítica observada em presença de 0.1% (v/v) de detergente líquido pode ser decorrente da inativação enzimática como resultado do rompimento da estrutura terciária da proteína, ou ainda devido a uma inibição do crescimento do microrganismo ou da expressão dessa proteína. Quando se lava louças, roupas ou chão, altas concentrações de detergente e sabão são liberadas nos efluentes em um curto período de tempo. De forma que é necessário escolher uma enzima relativamente estável para o tratamento de esgoto. Antagonicamente, a presença de 0,1% de detergente provocou um acréscimo de atividade lipásica em alguns isolados: A2, A8, B1, B2, B7, B10, C1, C2, D1, D3, D4 e D5, com destaque para atividade do isolado D4 que sofreu elevação de mais de 10 vezes (**tabela 3**).

Foi ainda, analisada a capacidade dos isolados de produzir múltiplas enzimas degradativas concomitantemente e observamos que os isolados B2, B8, C4, C5, D1, D2, e D7 apresentaram habilidades mais diversificadas para utilização/degradação de biopolímeros comumente presentes nos efluentes (**tabela 3**). Todos esses isolados citados demonstraram ter a capacidade de produzir, além da lipase, pelo menos uma protease e mais uma outra enzima hidrolítica. Dentre todos os microrganismos analisados, mais de 70% produzia duas enzimas ou mais. Essa abordagem multidegradativa permite o uso de um menor número de isolados e/ou seus extratos no tratamento de esgotos, já que cada um, individualmente, é capaz de secretar mais de uma enzima. Essa abordagem também reduz a necessidade de suplementação nutricional diferenciada no sistema como um todo. Dentre todos os extratos lipolíticos avaliados, aproximadamente 45% apresentou resistência a 0.25% (v/v) de H₂O₂, 20% demonstrou ser resistente a 0.1% (v/v) de NaClO ou 10 mM EDTA, e mais de 50% foi resistente ao tratamento com 0.1% (v/v) de detergente líquido (**tabela 3**).

Técnicas de biorremediação *in situ* incluem a introdução de diferentes linhagens de microrganismos vivos aos efluentes em diferentes estágios de tratamento. Todas as técnicas utilizadas para o tratamento de esgotos introduzem cepas microbianas na fase exponencial de crescimento. Porém, mesmo estes microrganismos estando em ativa multiplicação, eles requerem um tempo de adaptação para darem início à degradação dos substratos (Dash *et al.*, 2011). Estera e colaboradores (2006) desenvolveram uma metodologia para reduzir o tempo de degradação, o qual consiste em primeiro adicionar às águas residuais uma mistura enzimática que irá iniciar a degradação dos

biopolímeros. Somente depois dessa etapa é que pelo menos uma espécie de bactéria fermentadora, é adicionada ao sistema. Dash e colaboradores (2011) patentearam um sistema com ação sinérgica para o tratamento de esgotos e remoção de poluentes que consiste em uma mistura de microrganismos, enzimas, cofatores e nutrientes. Os microrganismos que compõem esse sistema são linhagens selecionadas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas desmolyticum*, *Coriolus versicolour*, *Lactobacillus sp.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus sp.* e *Phanerochaete chrysosporium*, isoladamente ou em combinações. E as enzimas presentes nesse composto são proteases, lipases, amilases, glicose oxidases e outras. Este composto apresenta uma ferramenta sinérgica e muito eficiente para remoção de poluentes orgânicos de efluentes. As enzimas atuam dissociando as moléculas em formas mais simples, que por sua vez, são utilizadas pelos microrganismos, o que resulta numa degradação completa. Com este sistema, os microrganismos crescerão mais rapidamente, devido à disponibilidade crescente de intermediários metabólicos e como consequência produzirão mais enzimas hidrolíticas que farão a degradação de mais poluentes. E assim, enzimas e microrganismos serão interdependentes e trabalharão de forma conjunta facilitando a degradação mais rápida e eficiente das moléculas de poluentes orgânicos (Dash *et al.*, 2011).

Diversos microrganismos são capazes de hidrolisar diferentes tipos de óleos. Entretanto, o processo de degradação pode ser lento, devido à baixa disponibilidade de água dissolvida no óleo (Snape *et al.*, 2006). Em condições naturais ou induzidas, muitos microrganismos são capazes de produzir bioemulsificantes, que reduzem o tempo necessário à degradação de óleos e gorduras por aumentar a biodisponibilidade deste substrato hidrofóbico (Banat *et al.*, 2000). A síntese de esterases associadas à membrana plasmática foi recentemente descrita em associação com surfactantes, sendo um indicativo da função conjunta entre a emulsificação e a lipólise (Mathur *et al.*, 2010; Bach *et al.*, 2003). Os biosurfactantes aumentam a absorção dos microrganismos, quando estes estão crescendo em substratos insolúveis, aumentando assim a eficiência de biorremediação (Saimmai *et al.*, 2012).

Foi demonstrado por Gautam & Tyagi (2006), Saharam e colaboradores (2011) e Pattanathu e colaboradores (2008) que diversas bactérias do gênero *Pseudomonas* são capazes de produzir diferentes classes de biosurfactantes. Em nosso trabalho, observamos que vários isolados pertencentes a este gênero e à classe **Bacilaceae** (A3, A4, A5, A6, A7, B3, B4, B5, B10, C2, C4, C5, D2, e D5) emulsificaram 2% de óleo de

soja em meio de cultura LB caldo suplementado com 1 mM de CaCl₂, apesar de não ter sido determinada qual era o tipo de biosurfactante produzido (**tabela 1**).

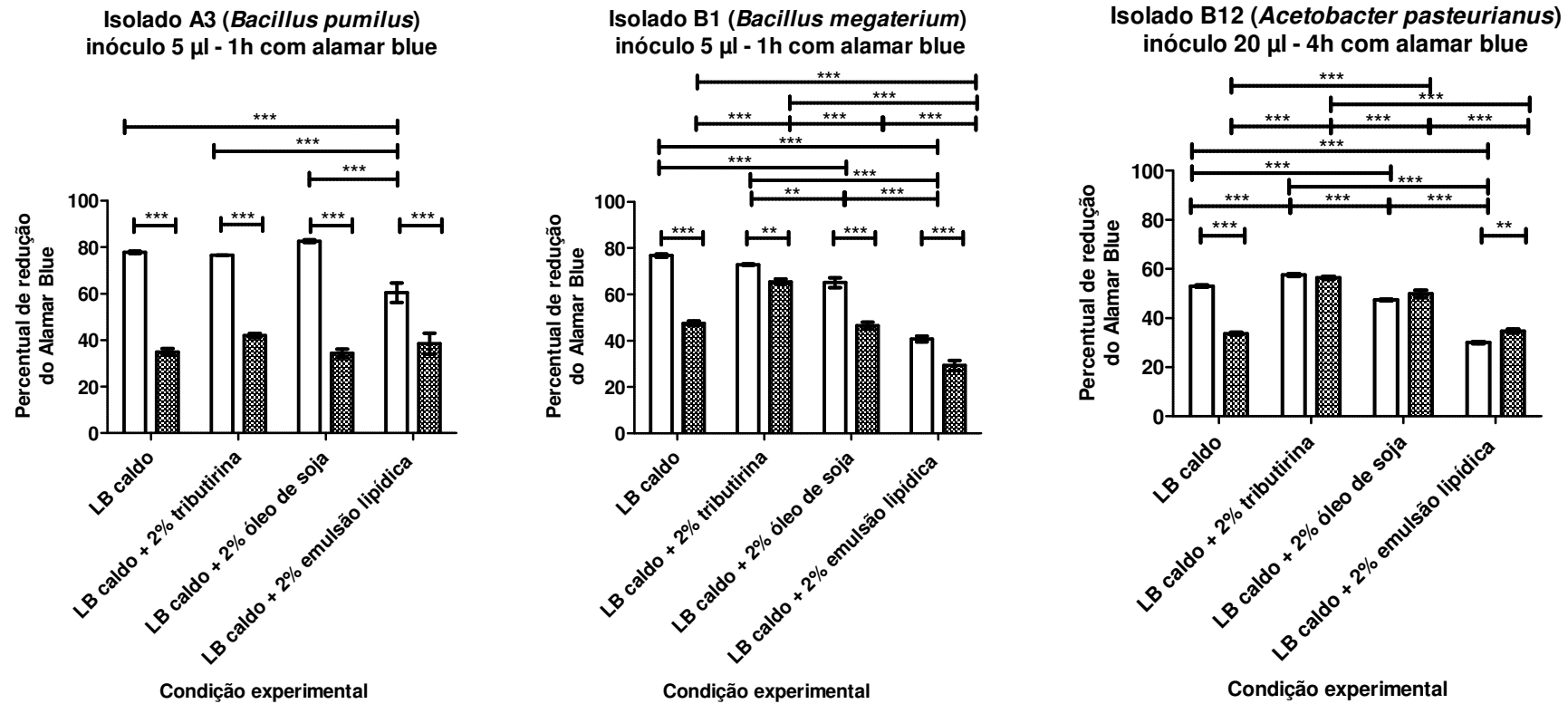
Acetobacter pasteurianus é uma bactéria acetogênica normalmente associada com a produção e degradação de vinhos (Prieto *et al.*, 2007). Ela produz ácido acético pela oxidação incompleta de uma fonte de carbono orgânica à CO₂ (Prieto *et al.*, 2007). Em nosso trabalho, os isolados B12 e B13 (de *Acetobacter pasteurianus*) foram associados aos rejeitos de uma indústria de laticínios, e à produção de lipases. No esgoto, a presença desta espécie é associada à acidificação da água, devido liberação do ácido acético. As lipases produzidas por estes isolados hidrolisaram preferencialmente ésteres de 4 carbonos e apresentaram maior atividade em pH básico. Porém, apesar destas similaridades os extratos enzimáticos destas duas linhagens apresentaram diferenças nos perfis de resistência térmica e química, indicando que deve se tratar de linhagens diferentes, que produzem enzimas distintas. Outra similaridade que pode ser percebida é que essas duas linhagens não produzem outro tipo de enzima hidrolítica além da lipase e também não produzem biosurfactantes.

De acordo com o que é descrito pela literatura, a emulsificação de lipídeos deveria favorecer a hidrólise, uma vez que a enzima hidrofílica teria maior superfície de contato com o substrato hidrofóbico, devido à desagregação das micelas. Para avaliar o comportamento de nossos isolados, cinco linhagens com diferentes perfis de emulsificação e hidrólise foram submetidas à quantificação metabólica por redução do alamar blue, em quatro diferentes condições: (i) meio de cultura LB caldo sem suplementação; (ii) meio LB caldo suplementado com 2% de tributirina (triglicerídeo de 4 carbonos); (iii) meio LB caldo suplementado com 2% de óleo de soja; e (iv) meio LB caldo suplementado com 2% de emulsão lipídica (**figura 15**). O alamar blue funciona com um ótimo indicador da atividade metabólica pois é um aceptor final de elétrons, em substituição ao oxigênio. A medida que o alamar é oxidado, ele muda de cor, o que é indicativo da atividade metabólica e a variação de cor pode ser quantificada por espectrofotometria. A curva inicial de redução do alamar blue indicou o melhor volume de pré-inóculo e tempo de incubação com o alamar para cada uma das 5 linhagens. Os gráficos apresentados na **figura 15** revelam que a presença de um óleo emulsificado no meio de cultura não elevou as taxas metabólicas de nenhum dos 5 isolados, e ao contrário, pode-se observar uma redução. Entretanto, a indução da produção de lipase pela adição de tributirina ao pré-inóculo, provou ser eficiente em elevar o metabolismo de gordura em todas as condições experimentais para os isolados A3 e B1. A única

situação em que a indução não foi eficiente em promover o aumento do metabolismo foi com o isolado B13, em que o pré-inóculo que não sofreu indução foi metabolicamente mais eficiente em todas as condições experimentais. Devido ao fato da produção de lipase ser influenciada pela fonte de carbono utilizada, a ausência de indução mediante a utilização de tributirina pode ser justificada, devido ao fato de que outras fontes de carbono não foram avaliadas como indutores, e esta poderia não ser a mais apropriada para a linhagem B13. O metabolismo das linhagens B1 e B12 foi consideravelmente maior em presença de tributirina do que em presença de óleo de soja, o que está de acordo com os resultados obtidos para hidrólise de p-NP ésteres (**tabela 2**), nos quais a hidrólise do éster de 4 carbonos (butirato) foi a mais eficiente. Resultados similares também foram observados para o isolado D4, que foi mais eficiente em hidrolisar o éster de p-NP de 10 carbonos (decanoato) e metabolicamente mais ativo em presença de 2% de óleo de soja (**figura 15**). Assim, fica claro que a utilização de um isolado para o tratamento de esgoto exige sua caracterização individual.

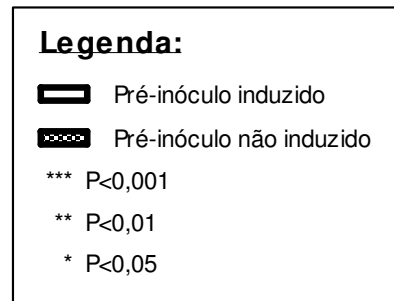
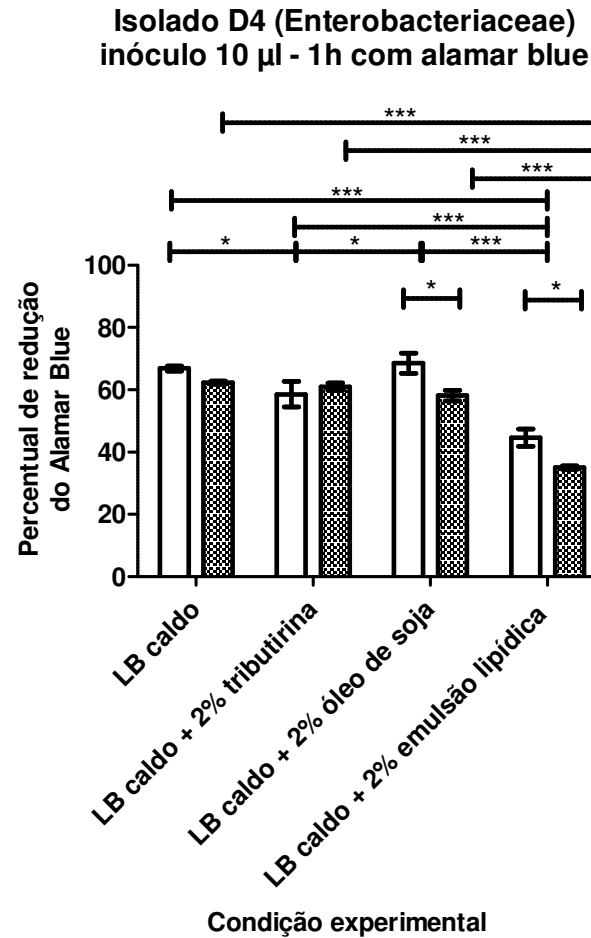
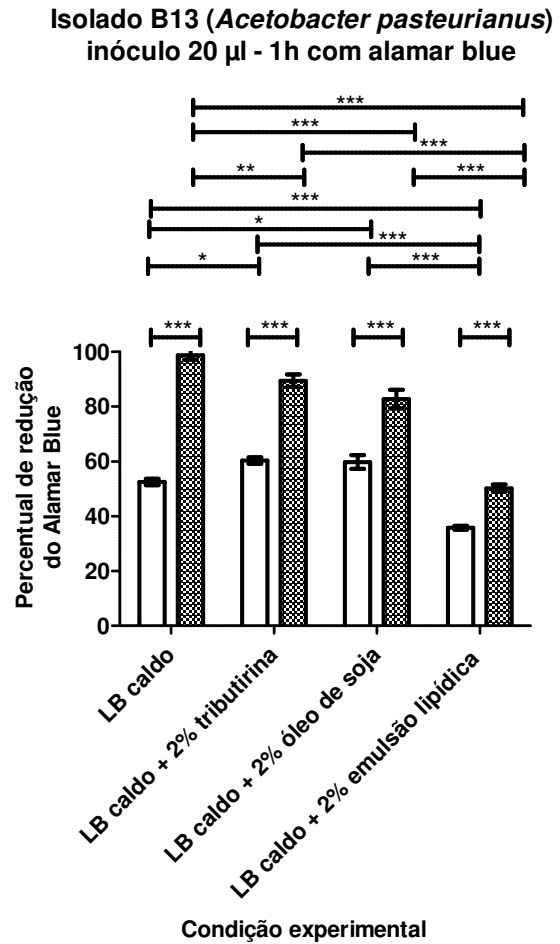
A celulose é o polímero orgânico renovável mais abundante no planeta. É também o contaminante mais comum nos efluentes de atividades agrícolas (Sukumaran *et al.*, 2005). Uma estratégia promissora para utilização deste recurso energético renovável é a hidrólise microbiana da lignocelulose subutilizada, descartada nesses efluentes, seguida pela fermentação dos compostos resultantes, resultando na produção de biocombustíveis ou outro composto com algum valor agregado (Sukumaran *et al.*, 2005) Dentre nossos isolados produtores de lipases, 34,3% apresentaram também a capacidade de hidrolisar a CM celulose. Parmar e colaboradores (2001) demonstraram que uma mistura de enzimas hidrolíticas como celulases, proteases e lipases, em proporções equivalentes, reduziu os sólidos totais em suspensão (TSS) de 30-50%, e melhoraram a sedimentação dos sólidos no lodo. Foi observado ainda, que um aumento na concentração das enzimas era acompanhado de um incremento proporcional na redução dos sólidos. Essa redução ocorria pela hidrólise residual dos polímeros remanescentes, provando que o sinergismo enzimático pode efetivamente reduzir a carga de matéria orgânica presente nos efluentes industriais em subestações de pré-tratamento.

Figura 15: Estado metabólico de 5 linhagens diferentes quando pré-inóculos induzidos e não induzidos foram desafiados à hidrólise de um triglicerídeo simples de cadeia curta, uma mistura complexa de triglicerídeos de cadeias longas (óleo de soja) e uma emulsão oleosa dessa mistura complexa de triglicerídeos.



(Continua ...)

(...Continuação da figura 15)



6. CONCLUSÕES

Culturas microbianas isoladas da vasta diversidade biológica constituem a maior fonte de recursos biológicos para uso em biocatálises industriais e outras aplicações ambientais. As lipases e esterases obtidas neste estudo apresentaram resistências e afinidades diversas. As enzimas foram caracterizadas a fim de identificar bons candidatos para o tratamento de esgotos. A estabilidade apresentada por alguns extratos lipolíticos após tratamento térmico e em presença de agentes químicos, além de atividade e estabilidade em uma ampla faixa de pH, e a afinidade por diferentes comprimentos de cadeias éster indica que algumas dessas enzimas poderão ser aplicadas na hidrólise de compostos orgânicos e biopolímeros, presentes em efluentes industriais e domésticos. Enzimas de origem bacteriana são robustas, apresentam atividade em pHs, temperaturas e substratos diversos, podendo ser facilmente utilizadas no pré-tratamento de esgoto, desde que sejam resistentes a alguns compostos químicos e apresentem baixo custo de produção. A ausência de necessidade de purificação enzimática para o tratamento de efluentes contribui para a redução dos custos. Ainda, a combinação de duas ou mais enzimas/linhagens microbianas pode facilitar o processo de hidrólise completa de triglicerídeos, proteínas e lignocelulose, comumente presentes em efluentes industriais. Entretanto, a seleção criteriosa das linhagens é essencial para facilitar o processo, pela utilização de menor número de linhagens, dado que uma linhagem multiprodutora de diferentes enzimas hidrolíticas atingirá o mesmo objetivo e irá necessitar a adição de menor número de suplementos nutricionais do que a utilização de linhagens múltiplas. A utilização sinérgica de enzimas e microrganismos selecionados irá garantir a hidrólise completa dos compostos orgânicos mais comumente descartados em efluentes. Evitar o descarte de compostos orgânicos na rede fluvial previne a necessidade de tratamento intensivo da água para consumo, além de longas redes de distribuição e da necessidade de remediação ecológica como acontece em alguns corpos de água brasileiros, por exemplo, Lagoa da Pampulha cartão postal de Belo Horizonte, extremamente poluído, ou os rios Tietê (São Paulo) e Arrudas (Minas Gerais). Para garantir uma melhor avaliação da capacidade degradativa destes microrganismos, estudos futuros focarão na simulação da hidrólise direta de efluentes industriais em escala laboratorial. Será abordada ainda a otimização das condições de hidrólise com objetivo de utilizar microrganismos e enzimas de forma sinérgica otimizando o tratamento de efluentes industriais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- International Union of Pure and Applied Chemistry/IUPAC. (1992) Biochemical Nomenclature Committees. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/jcbn/>
- ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas. (1986) NBR 9648/1986.
- Aboulhassan M.A., Souabi S., Yaacoubi A., & Baudu M. (2006) Removal of surfactant from industrial wastewaters by coagulation flocculation process. *International Journal of Environmental Sciences Technology* **3**: 327-332.
- Abouseoud M., Maachi R. & Amrane A. (2007) Biosurfactant Production from olive oil by *Pseudomonas fluorescens*. In: *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* (ed Méndez-Vilas A.), pp. 340-347. ©FORMATEX.
- Agência Nacional de Águas - Brasília: ANA. (2012) Panorama da qualidade das águas superficiais do Brasil: 2012. Agência Nacional de Águas - Brasília: ANA. -264. Brasília/Brasil.
- Akhtar N., Ghauri M.A., Iqbal A., Anwar M.A., & Akhtar K. (2008) Biodiversity and phylogenetic analysis of culturable bacteria indigenous to Khewra Salt Mine of Pakistan and their industrial importance. *Brazilian Journal of Microbiology* **39**: 143-150.
- Alberton D., Mitchell D.A., Cordova J., Peralta-Zamora P., & Krieger N. (2010) Production and application of *R. microsporus* lipases. *Food Technology and Biotechnology* **48**: 28-35.
- Angenent L.T., Karim K., Al-Dahhan M.H., Wrenn B.A., & Domiguez-Espinosa R. (2004) Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends in Biotechnology* **22**: 477-486.

- Anyanwu & Chukwudi U. (2010) Surface activity of extracellular products of a *Pseudomonas aeruginosa* isolated from petroleum contaminated soil. *International Journal of Environmental Sciences* **1**: 225-235.
- Arima K., Kakinuma A., & Tamura G. (1968) Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **31**: 488-494.
- Bach H., Bedichevsky Y., & Gutnick D. (2003) An exocellular protein from the oil-degrading microbe *Acinetobacter venetianus* RAG-1 enhances the emulsifying activity of the polymeric bioemulsifier emulsan. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 2608-2615.
- Banat I.M., Makkar R.S., & Cameotra S.S. (2000) Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology* **53**: 495-508.
- Barbieri E. (2005) Efeito do LAS-C12 (Dodecil Benzeno Sulfonato de Sódio) sobre alguns parâmetros do comportamento da tainha (*Mugil platanus*). *Atlântica, Rio Grande* **27**: 49-57.
- Barbieri E., Phan V.N., & Gomes V. (2000) Efeito do LAS-C12, Dodecil Benzeno Sulfonato de Sódio Linear, na taxa metabólica e na capacidade de natação de *Cyprinus carpio*. *Ecotoxicology and Environmental Restoration* **3**: 69-75.
- Barnett J.W., Kerridge G.J., & Russell J.M. (1994) Effluent treatment systems for the dairy industry. *Australian Biotechnology* **4**: 26-30.
- Batista R.M., Rufino R.D., Luna J.M., Souza J.E.G., & Sarubbo L.A. (2010a) Effect of medium components on the production of a biosurfactant from *Candida tropicalis*, applied to the removal of hydrophobic contaminants in soil. *Water Environment Research* **82**: 418-425.

- Becker P., Koster D., Popov M.N., Markossian S., Antranikian G., & Markl H. (1999a) The biodegradation of olive oil and treatment of lipid-rich wool wastewater under aerobic thermophilic condition. *Water Research* **33**: 653-660.
- Bhumibhamon O., Kopraserstak A., & Funthong S. (2002) Biotreatment of high fat and oil wastewater by lipase producing microorganisms. *Kasetsart Journal Natural Science* **36**: 261-267.
- Birnboim H.C. & Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**: 1513-1523.
- Bora L. & Kalita M.C. (2007) Production and optimization of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. LBN 4. *The Internet Journal of Microbiology* 4 [1] <http://www.ispub.com/journal/the-internet-journal-of-microbiology/volume-4-number-1/production-and-optimization-of-thermostable-lipase-from-a-thermophilic-bacillus-sp-lbn-4.html#sthash.qRHstqSc.dpbs>
- Bornscheuer T.U., Bessler C., Srinivas R., & Krishna H.S. (2002) Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in Biotechnology* **20**: 433-437.
- Bradner J.R., Bell P.J.L., Te'o V.S.J., & Nevalainen K.M.H. (2003a) The application of PCR for the isolation of a lipase gene from the genomic DNA of an Antarctic microfungus. *Current Genetics* **44**: 224-230.
- Bradoo S., Saxena R.K., & Gupta R. (1999) Two acidothermotolerant lipases from new variants of *Bacillus* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **15**: 87-91.
- Bramucci M., Kane H., Chen M., & Nagarajan V. (2003) Bacterial diversity in an industrial wastewater bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **62**: 594-600.
- Bussamara R., Fuentesfria A.M., Oliveira E.S., Broetto L., Simcikova M., Valente P., Schrank A., & Vainstein M.H. (2010) Isolation of a lipase-secreting yeast for

enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. *Bioresource Technology* **101**: 268-275.

Cavalcanti E.A.C., Gutarra M.L.E., Freire D.M.G., Castilho L.R., & Sant'Anna G.L.Jr. (2005) Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **48**: 79-84.

Cheryan M. & Rajagopalan N. (1998) Membrane processing of oil streams. Wastewater treatment and waste reduction. *Journal of Membrane Science* **151**: 13-28.

Chigusa S., Hasegawa T., Yamamoto N., & Watanabe Y. (1996) Treatment of wastewater from oil manufacturing plant by yeast. *Water Science and Technology* **34**: 51-58.

Christen G.L. & Marshall R.T. (1984) Selected properties of lipase and protease of *Pseudomonas fluorescens* 27 produced in four media. *Journal of Dairy Science* **67**: 1680-1687.

CodonCode Corporation. (2011) CodonCode Aligner. [V.3.7.1 DEMO] Centerville, MA, USA.

CONAMA 357 - Conselho Nacional do Meio Ambiente. (2005a) LEGISLAÇÃO AMBIENTAL FEDERAL, resolution 357. www.mma.gov.br

COPASA - Companhia de Saneamento de Minas Gerais. (2012) Processos de Tratamento. <http://www.copasa.com.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=34>

Corcoran E., Nellesmann C., Baker E., Bos R., Osborn D., & Savelli H. (2010) Sick Water? The central role of wastewater management in sustainable development. United Nations Environment Programme, UNEP, UN-HABITAT, and GRID-Arendal. Birkeland Trykkeri AS, Norway.

- Côté A. & Shareck F. (2008) Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Enzyme and Microbial Technology* **42**: 381-388.
- Dash S.S., Subramani R., & Kompala D.S. (2011) A method for rapid treatment of wastewater and a composition thereof. *World Intellectual Property Organization* (WIPO) No. WO 2011/161695 A2
- Departamento de Informação Pública das Nações Unidas. (2012) Rio +20: Conferência das Nações Unidas sobre desenvolvimento sustentável.
<http://www.onu.org.br/rio20/temas-agua/>
- Desai J.D. & Banat I.M. (1997) Microbial production of biosurfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**: 47-64.
- Dharmstithi S. & Luchai S. (1999) Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027. *FEMS Microbiology Letters* **179**: 241-246.
- Dhouib A., Hamad N., Hassairi I., & Sayadi S. (2003) Degradation of anionic surfactants by *Citrobacter braakii*. *Process Biochemistry* **38**: 1245-1250.
- Drewes J. & Croue J.-P. (2002) New approaches for structural characterization of organic matter in drinking water and wastewater effluents. *Water Science and Technology* **2**: 1-10.
- Eggert T., Van Poueroyes G., Pencreac'h G., Douchet I., Verger R., Dijkstra B.W., & Jaeger K.-E. (2002) Biochemical properties and three-dimensional structures of two extracellular lipolytic enzymes from *Bacillus subtilis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **26**: 37-46.
- Environmental Oasis Ltd. (2012) <http://www.oasisenviro.co.uk/ww07ppproductinfo.html>

- Estera S.D., Lund S., Olof N., & Helsingborg S. (2006) Method for digestion of sludge in water purification. US Patent No. 20060086659, PCT No. PCT/SE03/01436
- Facchin S. (2007) Avaliação da qualidade higiênico sanitária e das populações de leveduras presentes na mussarela de búfala comercializada em Belo Horizonte/MG e durante o processo de fabricação. Pós Graduação em Microbiologia - Instituto de Ciências Biológicas : -85. Belo Horizonte/Minas Gerais/Brasil, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Fakhreddine L., Kademi A., Ait-Abdelkader N., & Baratti J.C. (1998) Microbial growth and lipolytic activities of moderate thermophilic bacterial strains. *Biotechnology Letters* **20**: 879-883.
- Felske A., Rheims H., Wolterink A., Stackebrandt E., & Akkermans A.D.L. (1997) Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grassland soils. *Microbiology* **143**: 2983-2989.
- Fundação Nacional de Saúde F. (2006) Manual de saneamento, 3ª ed. rev. edn. **Brasília, Brasil.**
- Gautam K.K. & Tyagi V.K. (2006) Microbial surfactants: a review. *Journal of Oleo Science* **55**: 155-166.
- Ghanem E.H., Al-Sayeed H.A., & Salch K.M. (2000) An alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **16**: 459-464.
- Gharaei-Fathabad E. (2011) Biosurfactants in pharmaceutical industry: a mini-review. *American Journal of Drug Discovery and Development* **1**: 58-69.
- Gilham D. & Lehner R. (2005) Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods* **36**: 139-147.
- Gill J. & Parish J.H. (1997) Minireview: lipases - enzymes at an interface. *Biochemical Education* **25**: 2-5.

- Godfrey T. & West S. (1996) *Industrial Enzymology*, 2 edn. Macmillan Publishers, Inc., New York.
- GraphPad Software. (2009) Prism 5 for Windows. [Version 5.03] San Diego California USA.
- Gupta R., Beg Q.K., & Lorenz P. (2002) Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **59**: 15-32.
- Gupta R., Gupta N., & Rathi P. (2004) Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology* **64**: 763-781.
- Gupta R., Khasa Y.P., & Kuhad R.C. (2011a) Evaluation of pretreatment methods in improving the enzymatic saccharification of cellulosic materials. *Carbohydrate Polymers* **84**: 1103-1109.
- Gupta R., Mehta G., Khasa Y.P., & Kuhad R.C. (2011b) Fungal delignification of lignocellulosic biomass improves the saccharification of celluloses. *Biodegradation* **22**: 797-804.
- Gurr M.I. & Harwood J.L. (1996) In: *Lipid Biochemistry: An Introduction*, 4 edn, pp. 162-243. Chapman & Hall, London.
- Hassan F., Shah A.A., & Abul-Hameed A. (2006) Influence of culture conditions on lipase production by *Bacillus* sp. FH5. *Annals of Microbiology* **56**: 247-252.
- Holbrook R.D., Breidenich J., & Derosé P. (2005) Impact of Reclaimed Water on Select Organic Matter Properties of a Receiving Stream- Fluorescence and Perylene Sorption Behavior. *Environmental Science & Technology* **39**: 6453-6460.
- Holbrook R.D., Love N.G., & Novak J.T. (2004) Sorption of 17 β -Estradiol and 17 α -Ethinylestradiol by Colloidal Organic Carbon Derived from Biological Wastewater Treatment Systems. *Environmental Science & Technology* **38**: 3322-3329.

- Holmquist M., Tessier D.C., & Cygler M. (1997) Identification of residues essential for differential fatty acyl specificity of *Geotrichum candidum* lipases I and II. *Biochemistry* **36**: 15019-15025.
- Hu W.C., Thayanithy K., & Forster C.F. (2002) A kinetic study of the anaerobic digestion of ice-cream wastewater. *Process Biochemistry* **37**: 965-971.
- Huber T., Faulkner G., & Hugenholtz P. (2004) Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* **20**: 2317-2319. <http://comp-bio.anu.edu.au/Bellerophon/doc/doc.html>
- Ichida J.M., Krizova L., LeFevre C.A., Keener H.M., Elwell D.L., & Burt Jr E.H. (2001) Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *Journal of Microbiological Methods* **47**: 199-208.
- Imhoff K.R. & Imhoff K. (1996) Manual de tratamento de águas residuárias. Edgard Blucher, São Paulo.
- Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada B. (2010) Objetivos de Desenvolvimento do Milênio - 4 Relatório Nacional de Acompanhamento. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, Brasília. 184p.
- International Union of Pure and Applied Chemistry/IUPAC. (1992) Biochemical Nomenclature Committees. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/jcbtn/>
- Jaeger K.E., Dijkstra B.W., & Reetz M.T. (1999) Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annual Review Microbiology* **53**: 315-351.
- Jaeger K.-E., Ransak S.F., Dijkstra B.W., Colson C., Heuvel M.V., & Misset O. (1994) Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Review* **15**: 29-63.
- Jaeger K.E. & Reetz M.T. (1998) Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology* **16**: 396-403.

- Jordão E.P. & Pessoa C.A. (1995) Tratamento de Esgotos Domésticos, 3 edn. Rio de Janeiro.
- Kanwar L. & Goswami P. (2002) Isolation of a *Pseudomonas* lipase produced in pure hydrocarbon substrate and its applications in the synthesis of isoamyl acetate using membrane-immobilized lipase. *Enzyme and Microbial Technology* **31**: 727-735.
- Karleskind A. (1996) Oils and Fats: Manual. Lavoisier Publishing, Paris.
- Karmakar M. & Ray R.R. (2011) Current trends in research and application of microbial cellulases. *Research Journal of Microbiology* **6**: 41-53.
- Kotlova E.K., Ivanova N.M., Yusupova M.P., Voyushina T.L., Ivanushkina N.E., & Chestukhina G.G. (2007) Thiol-dependent serine proteinase from *Paecilomyces lilacinus*: Purification and catalytic properties. *Biochemistry (Moscow)* **72**: 117-123.
- Kuhad R.C., Gupta R. & Khasa Y.P. (2010) Bioethanol production from lignocellulosic biomass: an overview. In: *Wealth from Waste* (ed Lal B.) Teri Press, New Delhi, India.
- Kuhad R.C., Rishi G., & Singh A. (2011) Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research*.
- Kumar C.G. & Takagi H. (1999) Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances* **17**: 561-594.
- Kumar S., Kikon K., Upadhyay A., Kanwar S.S., & Gupta R. (2005) Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression and Purification* **41**: 38-44.
- Kunamneni A., Ellaiah P., & Prasad S.D. (2003) Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *AAPS PharmSciTech* **4**: 440-448.

- Lachance M.A., Bowles J.M., Starmer W.T., & Barker J.S.F. (1999) *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian Hibiscus flowers. *Canadian journal of microbiology* **45**: 172-177.
- Lane D.J. (1991) 16S/23S rDNA sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (eds Stackebrandt E. & Goodfellow M.), pp. 115-148. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Lang S. (2002) Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **7**: 12-20.
- Leal M.C.C.R., Freire D.M.G., Cammarota M.C., & Sant'Ana G.L.Jr. (2006) Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. *Process Biochemistry* **41**: 1173-1178.
- Lee O.-W., Koh Y.-S., Kim K.-J., Kim B.-C., Choi H.-J., Kim D.-S., Suhartono M.T., & Pyun Y.-R. (1999) Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiology Letters* **179**: 393-400.
- Lee S.-W., Won K., Lim H.K., Kim J.C., Choi G.J., & Cho K.Y. (2004) Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Applied and Microbiological Biotechnology* **65**: 720-726.
- Lefebvre X., Paul E., & Mauret M. (1998) Kinetic characterization of saponified domestic lipid residues aerobic biodegradation. *Water Research* **32**: 3031-3038.
- Lindberg R.A., Rhodes W.G., Eirich L.D., & Drucker H. (1982) Extracellular acid proteases from *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology* **150**: 1103-1108.
- Litthauer D., Ginster A., & Skein E.V.E. (2002) *Pseudomonas luteola* lipase: a new member of the 320-residue *Pseudomonas* lipase family. *Enzyme and Microbial Technology* **30**: 209-215.
- Liu J. & Mattiasson B. (2002) Microbial BOD sensors for wastewater analysis. *Water Research* **36**: 3786-3802.

- Lomans B.P., Luderer R., Steenbakkers P., Pol A., van Der Drift C., Vogels G.D., & Op Den Camp J.J.M. (2001) Microbial populations involved in cycling of dimethyl sulfide and methanethiol in freshwater sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 1044-1051.
- Lomans B.P., Op Den Camp J.J.M., Pol A., & Vogels G.D. (1999) Anaerobic versus aerobic degradation of dimethyl sulfide and methanethiol in anoxic freshwater sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 438-443.
- Luna J.M., Rufino R.D., Campos-Takaki G.M., & Sarubbo L.A. (2012) Properties of the Biosurfactant Produced by *Candida Sphaerica* Cultivated in Low-Cost Substrates. *Chemical Engineering Transactions* **27**: 67-72.
- Lynd L.R., Wyman C.E., & Gerngross T.U. (1999) Biocommodity engineering. *Biotechnology Progress* **15**: 777-793.
- Makkar R. & Cameotra S. (1997) Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **18**: 37-42.
- Makkar R.S. & Rockne K.J. (2003) Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**: 2280-2292.
- Marchessault R.H. & Sundararajan P.R. (1993) Cellulose. In: *The Polysaccharides* (ed Aspinall G.O.), pp. 11-95. Academic Press, New York.
- Masse L., Kennedy K.J., & Chou S. (2001) Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater. *Bioresource Technology* **77**: 145-155.
- Mathur C., Prakash R., Ali A., Kaur J., Cameotra S.S., & Prakash N.T. (2010) Emulsification and Hydrolysis of Oil by *Syncephalastrum racemosum*. *Defence Science Journal* **60**: 251-254.

- Mehreb-Dini C., Cabral H., Leite R.S.R., Zanphorlin L.M., Okamoto D.N., Rodriguez G.O.B., Juliano L., Arantes E.C., Domes E., & Da Silva R. (2009) Biochemical and functional characterization of a metalloprotease from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**: 9210-9217.
- Mendes A.A. & Castro H.F. (2005) Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. *Química Nova* **28**: 296-305.
- Mongkolthanaruk W. & Dharmsthiti S. (2002) Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation* **50**: 101-105.
- Moussa T.A.A., Ahmed A.M., & Abdelhamid S.M.S. (2006) Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Nocardia amarae*. *Journal of Applied Sciences Research* **11**: 844-850.
- Mulligan C.N. (2005) Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution* **133**: 183-198.
- Natural Environmental Systems 1. (2012) <http://www.naturalenviro.com/Article.php?ArticleSKU=Surfactants-Enzymes-In-Wastewater> Dallas/Texas/EUA, Natural Environmental Systems, llc.
- NCBI/Genbank. (2012) *BLASTn*. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nini L., Sarda L., Louis-Claude C., Boitard E., Jean-Paul D., & Chahinian H. (2001) Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a Kinetic study. *Biochemical Biophysics Acta* **1534**: 34-44.
- Nitschke M. & Pastore G.M. (2006) Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technology* **97**: 336-341.

- Parmar N., Singh A., & Ward O.P. (2001) Enzyme treatment to reduce solids and improve settling of sewage sludge. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **26**: 383-386.
- Pattanathu K.S.M., Rahman K.S.M., & Gakpe E. (2008) Production, characterisation and applications of biosurfactants - Review. *Biotechnology* **7**: 360-370.
- Perle M., Kimchie S., & Shelef G. (1995) Some biochemical aspects of the anaerobic degradation of dairy wastewater. *Water Research* **29**: 1549-1554.
- Peypoux F., Bonmatin J.M., & Wallach J. (1999) Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**: 553-563.
- Plaza G.A., Pacwa-Plociniczac M., Piotrowska-Seget Z., Jangid K., & Wilk K.A. (2011) Agroindustrial wastes as unconventional substrates for growing of *Bacillus* strains and production of biosurfactant. *Environment Protection Engineering* **37**: 63-71.
- Pontes D.S., Pinheiro F.A., Lima-Bittencourt C.I., Guedes R.L., Cursino L., Barbosa F., Santos F.R., Chartone-Souza E., & Nascimento A.M. (2009) Multiple antimicrobial resistance of gram-negative bacteria from natural oligotrophic lakes under distinct anthropogenic influence in a tropical region. *Microb.Ecol.* **58**: 762-772.
- Prakasham R.S., Rao C.S., & Sharma P.N. (2006) Green gram husk - an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation. *Bioresource Technology* **97**: 1449-1454.
- Prieto C., Jara C., Mas A., & Romero J. (2007) Application of molecular methods for analysing the distribution and diversity of acetic acid bacteria in Chilean vineyards. *International journal of food microbiology* **115**: 348-355.
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., & Deshpande V.V. (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**: 597-635.

- Rashid N., Shimada Y., Ezaki S., Atomi H., & Imanaka T. (2001) Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 4064-4069.
- Rathi P., Saxena R.K., & Gupta R. (2001) A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochemistry* **37**: 187-192.
- Ribosomal Database Project/RDP. (2013) *Sequence match & Classifier*.
<http://rdp.cme.msu.edu/html/>
- Rigo E., Rigoni R.E., Lodea P., Oliveira D., Freire D.M.G., & Luccio M. (2008) Application of different lipases as pretreatment in anaerobic treatment of wastewater. *Environmental Engineering Science* **25**: 1243-1248.
- Ron E.Z. & Rosenberg E. (2001) A review of natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology* **3**: 229-236.
- Rossi A. (2012) Qualidade da água é insatisfatória em rios de 11 estados brasileiros. <http://g1.globo.com/natureza/noticia/2012/03/aguas-de-rios-sao-classificadas-como-ruim-e-regular-por-sos-mata-atlantica.html>
- Ruegger M.J.S. & Tauk-Tornisielo S.M. (2004) Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Brazilian Journal of Botany* **27**: 205-211.
- Saharan B.S., Rahu R.K., & Sharma D. (2011) A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. *Genet Eng Biotechnol J.GEBJ-29 OpenURL*.
- Saimmai A., Rukadee O., Onlamool T., Sobhon V., & Maneerat S. (2012) Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by a new and promising strain of *Oleomonas sagaranensis* AT18. *World Journal of Microbiology Biotechnology* **28**: 2973-2986.

Sharma R., Chisti Y., & Banerjee U.C. (2001) Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances* **19**: 627-662.

Sigma Aldrich. (2012a) p-nitrofenol butirato.
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n9876?lang=pt®ion=BR>

Sigma Aldrich. (2012b) p-nitrofenol decanoato.
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n0252?lang=pt®ion=BR>

Sigma Aldrich. (2012c) p-nitrofenol palmitato.
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n2752?lang=pt®ion=BR>

Snape I., Ferguson S., Harvey PM., & Riddle M. (2006) Investigation of evaporation and biodegradation of fuel spills in Antarctica: II extent of natural attenuation at Casey station. *Chemosphere* **63**: 89-98.

Souza P.M. & Magalhães P.O. (2010) Application of microbial α -amylase in industry - a review. *Brazilian Journal of Microbiology* **41**: 850-861.

Srivastava A. & Prasad R. (2000) Triglycerides-based diesel fuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **4**: 111-133.

Stoll U. & Gupta H. (1997) Management strategies for oil and grease residues. *Waste Management & Research* **15**: 23-32.

Straka F., Jenicek P., Zabranska J., Dohanyos M., & Kuncarova M. (2007) Anaerobic fermentation of biomass and wastes with respect to sulfur and nitrogen contents in treated materials. Eleventh International Waste Management and Landfill Symposium

Sukumaran R.K., Singhania R.R., & Pandey A. (2005) Microbial cellulases - Production, applications and challenges. *Journal of Scientific & Industrial Research* **64**: 832-844.

- Sunna A., Hunter L., Hutton C.A., & Bergquist P.L. (2002) Biochemical characterization of a recombinant thermoalkalophilic lipase and assessment of its substrate enantioselectivity. *Enzyme and Microbial Technology* **31**: 472-476.
- Tanyildizi M.S., Ozer D., & Elibol M. (2005) Optimization of α -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. *Process Biochemistry* **40**: 2291-2296.
- Tomic S. & Ramek M. (2006) Quantum mechanical study of *Burkholderia cepacia* lipase enantioselectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **38**: 139-147.
- UNDESA. (2009) Millennium development goals report 2009. New York, United Nations Department of Economic and Social Affairs.
- Van Dyke M.I., Lee H., & Trevors J.T. (1991) Application of microbial surfactants. *Biotechnology Advances* **9**: 241-252.
- Vidal G., Carvalho A., Méndez R., & Lema J.M. (2000) Influence of the content in fats and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. *Bioresource Technology* **74**: 231-239.
- Von Sperling M. (1996) Princípios básicos do tratamento de esgotos - Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. UFMG, Belo Horizonte.
- Vuong C., Gotz F., & Otto M. (2000) Construction and characterization of an *agr* deletion mutant of *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity* **68**: 1048-1053.
- Wagner M., Loy A., Nogueira R., Purkhold U., Lee N., & Daims H. (2002) Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 665-680.

- WHO/UNICEF. (2008) Joint Monitoring Programme on water Supply and Sanitation. New York, Geneva, United Nations Children's Fund and the World Health Organization.
- Windish W.W. & Mhatre N.S. (1965) Microbial amylases. In: *Advances in Applied Microbiology* (ed Wu W.), pp. 273-304.
- Wong H. & Schotz M.C. (2002) The lipase gene family. *Journal of Lipid Research* **43**: 993-999.
- Xu X. (2000) Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. *European Journal of Lipid Science and Technology* **102**: 287-303.
- Zhang J.W. & Zeng R.Y. (2008) Molecular cloning and expression of a cold-adapted lipase gene from an Antarctic deep sea psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. 7323. *Marine Biotechnology* **10**: 612-621.
- Zhang Y., Rittmann B.E., Wang J., Sheng Y., Yu J., Shi H., & Qian Y. (2005) High-carbohydrate wastewater treatment by IAL-CHS with immobilized *Candida tropicalis*. *Process Biochemistry* **40**: 857-863.

8. ANEXOS

8.1. Artigos publicados:

(Jan/2013 - VEJA A SEGUIR REPRODUÇÃO INTEGRAL DO CONTEÚDO)

Vol.3, No.1, 34-47 (2013)
doi:10.4236/oje.2013.31005

Open Journal of Ecology

Biodiversity and secretion of enzymes with potential utility in wastewater treatment

Susanne Facchin^{1,2}, Priscila Divina Diniz Alves², Flávia de Faria Siqueira¹,
Tatiana Moura Barroca¹, Júnia Maria Netto Victória², Evanguedes Kalapothakis^{1*}

¹Departamento de Genética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil;

*Corresponding Author: kalapothakis@gmail.com

²Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda, Belo Horizonte, Brazil

Received 1 December 2012; revised 31 December 2012; accepted 8 January 2013

8.2. Artigos aceitos para publicação:

Aceite em outubro/2012: Brazilian Journal of Microbiology

Yeasts and hygienic-sanitary microbial indicators in water buffalo
mozzarella produced and commercialized in Minas Gerais, Brazil

Susanne Facchin¹, Anne C. Barbosa¹, Luiz S. Carmo¹, Maria Crisolita C. Silva², Afonso L.
Oliveira³, Paula B. Morais⁴, Carlos A. Rosa^{1*}

¹ Departamento de Microbiologia, ICB, CP. 486, Universidade Federal de Minas Gerais,
Belo Horizonte, MG, 31270-901 Brazil.

² Laboratório de Enterotoxinas, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte MG, Brazil

³ Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG,
Brazil

⁴ Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia, Campus Universitário de
Palmas, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, TO 77020220, Brazil

8.3. Artigos em colaboração:

2010



Molecular cloning and expression of epsilon toxin from *Clostridium perfringens* type D and tests of animal immunization

A.M. Souza^{1,2}, J.K.P. Reis¹, R.A. Assis¹, C.C. Horta¹, F.F. Siqueira¹, S. Facchin¹, E.R. Alvarenga¹, C.S. Castro¹, F.M. Salvaremi³, R.O.S. Silva⁴, P.S. Pires⁵, C. Contigli⁶, F.C.F. Lobato^{6*} and E. Kalapothakis^{1,6*}

¹Laboratório de Marcadores Moleculares e Biotecnologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil
²Laboratório de Anaeróbios, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil
³Laboratório de Retrovírus da Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG, Brasil
⁴Laboratório Nacional Agropecuário Pedro Leopoldo/Minas Gerais, Ministério da Agricultura, Belo Horizonte, MG, Brasil
⁵Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC), Belo Horizonte, MG, Brasil

*These authors contributed equally to this study.
Corresponding author: E. Kalapothakis
E-mail: ekalapo@icb.ufmg.br

Genet. Mol. Res. 9 (1): 266-276 (2010)
Received October 13, 2009
Accepted November 9, 2009
Published February 18, 2010